

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001887

International filing date: 09 February 2005 (09.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-368509
Filing date: 20 December 2004 (20.12.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/JP2005/001887

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

25.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 1 2 月 2 0 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 3 6 8 5 0 9

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

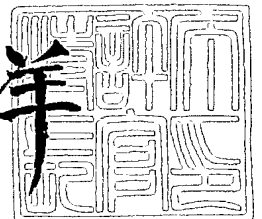
J P 2 0 0 4 - 3 6 8 5 0 9

出 願 人
Applicant(s): エーザイ株式会社

2 0 0 5 年 4 月 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 3 1 5 2 4

【書類名】 特許願
【整理番号】 EP04MK1201
【提出日】 平成16年12月20日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波
 研究所内
 【氏名】 飛弾 隆之
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波
 研究所内
 【氏名】 広橋 智子
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波
 研究所内
 【氏名】 澤井 徹
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波
 研究所内
 【氏名】 生木 尚志
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波
 研究所内
 【氏名】 高橋 英機
【特許出願人】
 【識別番号】 0000000217
 【氏名又は名称】 エーザイ株式会社
 【代表者】 内藤 晴夫
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2004- 31591
 【出願日】 平成16年 2月 9日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 004983
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩を含有してなる摂食亢進剤。

【請求項 2】

次の工程；被験物質を、

(A) リラキシナー 3 受容体、リラキシナー 3 受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

(B) リラキシナー 3 受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする摂食を亢進する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 3】

次の工程；

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A) リラキシナー 3 受容体、リラキシナー 3 受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、
を含むことを特徴とする摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 4】

次の工程；

(B) リラキシナー 3 受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする請求項 3 に記載の摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 5】

リラキシナー 3 受容体が、SALPR またはその部分ポリペプチドであることを特徴とする請求項 2～4 のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 6】

SALPR が、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする請求項 5 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 7】

次の工程；被験物質を、

(A) リラキシナー 3 受容体、リラキシナー 3 受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

(B) リラキシナー 3 受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする摂食を亢進する化合物またはその塩のスクリーニングキット。

【請求項 8】

次の工程；

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A) リラキシナー 3 受容体、リラキシナー 3 受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、
を含むことを特徴とする摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニングキット。

【請求項 9】

次の工程；

(B) リラキシン-3 受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、を含むことを特徴とする請求項 8 に記載の摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニングキット。

【請求項 10】

リラキシン-3 受容体が、SALPR またはその部分ポリペプチドであることを特徴とする請求項 7～9 のいずれか一項に記載のスクリーニングキット。

【請求項 11】

SALPR が、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする請求項 10 に記載のスクリーニングキット。

【請求項 12】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩を含有してなる体重増加を必要とする疾患の治療剤。

【請求項 13】

疾患が拒食症である請求項 12 に記載の治療剤。

【請求項 14】

次の工程；被験物質を、

(A) リラキシン-3 受容体、リラキシン-3 受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

(B) リラキシン-3 受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、を含むことを特徴とする体重増加作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 15】

次の工程；

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A) リラキシン-3 受容体、リラキシン-3 受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

を含むことを特徴とする体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 16】

次の工程；

(B) リラキシン-3 受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、を含むことを特徴とする請求項 15 に記載の体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 17】

リラキシン-3 受容体が、SALPR またはその部分ポリペプチドであることを特徴とする請求項 14～16 のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 18】

SALPR が、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする請求項 17 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 19】

次の工程；被験物質を、

(A) リラキシン-3 受容体、リラキシン-3 受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

(B) リラキシン-3 受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする体重増加作用を有する化合物またはその塩のスクリーニングキット。

【請求項 20】

次の工程；

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A) リラキシン-3 受容体、リラキシン-3 受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

を含むことを特徴とする体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニングキット。

【請求項 21】

次の工程；

(B) リラキシン-3 受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする請求項 20 に記載の体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニングキット。

【請求項 22】

リラキシン-3 受容体が、SALPR またはその部分ポリペプチドであることを特徴とする請求項 19～21 のいずれか一項に記載のスクリーニングキット。

【請求項 23】

SALPR が、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする請求項 22 に記載のスクリーニングキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】スクリーニング方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、有用な摂食亢進作用および体重増加作用を有するポリペプチド、該ポリペプチドを含有する体重増加を必要とする疾患の治療剤、該ポリペプチドの受容体の賦活化、抑制化をする化合物、物質もしくはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、あるいは該ポリペプチドの発現を阻害する物質などを含有してなる摂食抑制剤、抗肥満剤または糖尿病治療薬などに関する。

【背景技術】

【0002】

摂食は動物が生きていくために欠かせない行動である。肥満は飽食時代の現代社会にあつて、摂食量とエネルギー消費の調節・バランスが崩れた結果として生じたものであると考えられている。肥満は生活習慣病を始めとする各種疾病の危険因子でもあるため、社会的な関心が高まってきている。食事療法や運動療法など、摂食量とエネルギー消費のバランスを改善する基本的な治療法はあるものの、現状では肥満患者・その予備群は増加している。最近では末梢組織での栄養吸収を抑制する薬剤や中枢性に作用し摂食量を減少させる薬剤も開発されているが、肥満治療剤として摂食量を抑制する有効かつ安全な薬剤の開発は望まれている。

【0003】

摂食行動は脳中枢神経からの指令と、末梢組織からのフィードバックによって中枢神経がさらに指令を送る循環で制御されていることがわかりつつあり、その主体である脳での摂食制御機構に焦点を当てた研究が盛んに行なわれている。脳の特定領域を破壊した動物の研究や、神経ペプチドや神経伝達物質を用いた機能解析により、視床下部領域が摂食行動に重要な役割を果たしていることが分かってきている。また、視床下部には多くの神経伝達物質や神経ペプチドおよびそれらに対する受容体（レセプター）が発現しており、これらと摂食行動との関連が示されている。例えば摂食の亢進には視床下部弓状核に存在するニューロペプチドYやアグーチ関連ペプチド等に関わることで、さらに摂食の抑制には同所に存在するメラノコルチンや視床下部室傍核から放出されるコルチコトロピン放出ホルモンやサイトロピン放出ホルモンが関わっていることが報告されている（非特許文献1）。しかしながら、摂食を制御する複雑な神経ネットワークには未だ不明な部分が多く、未だなお新規な神経伝達因子やその局在についての新たな知見が得られつつある状況である。

【0004】

摂食行動の制御に関わる神経伝達物質や神経ペプチドなどの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプターを介して機能を発揮する。これらのレセプターの中で細胞膜を7回貫通する構造を有し、細胞内で3量体Gタンパク質と共役するレセプターは特にGタンパク質共役型受容体（GPCR）と分類されている。GPCRは特異的なリガンドが結合した時に細胞内にシグナルを伝達し、細胞の賦活化や抑制化をすることで、各種臓器・器官での機能発現に重要な役割を担っている。それ故にGPCRを賦活化するアゴニストや抑制するアンタゴニストと呼ばれる物質は、医薬品として使用されている。GPCRに分類されるレセプターの中でもその特異的なリガンドが未同定のものが数多く知られており、それらはオーファンGPCRと呼ばれている。オーファンGPCRは新たな治療薬のターゲットとしての可能性を秘めており、生体内のリガンド同定や機能を賦活もしくは抑制する物質の研究が進められている。このようにして同定されたりガンドや物質を生体に投与してレセプターとそのリガンドの機能を解明することは、医薬品の開発を提供する上できわめて重要である。

【0005】

近年の遺伝子配列情報の充実により、既知のタンパク質・ペプチドの配列を元にその相同性や法則性を導きだし、未知のペプチドやタンパク質を予測して、GPCRの新たなリ

ガンドとして同定する方法も可能となった。インスリン・リラキシン (Insulin・Relaxin) ファミリーに属するリラキシンは、黄体や胎盤から産生される分泌ペプチドであり、妊娠の維持と出産に関わる作用をもつことが以前から知られていた。それ以外の作用としては、例えばリラキシンのラット静脈内投与による摂水量の亢進という報告はなされているが (非特許文献2)、リラキシンの摂食行動との関連については知られていない。リラキシンをコードするDNAの塩基配列を元に遺伝子配列データベースから新たに同定されたDNAのコードするタンパク質が、リラキシン-3 (Relaxin-3) / INS L7と名づけられたポリペプチドである (特許文献1)。見出されたリラキシン-3は、免疫細胞系であるTHP-1の細胞内サイクリックAMP (cAMP) の上昇をともなって細胞を賦活化することが報告された (特許文献2、非特許文献3)。その後リラキシン-3は、リラキシンファミリーであるH1リラキシン、H2リラキシンと共に、GPCRであるLGR7に結合するリガンドの一つであることが示された (非特許文献4)。LGR7は脳と末梢組織に発現しており、これまでに生殖器官の発達や妊娠・出産に関わるということが示唆されているが、摂食との関連については良く分かっていない。

【0006】

一方、GPCRの一つにSALPR/GPCR135と名づけられているレセプターがある (特許文献3)。SALPRは脳に局在するレセプターとして発見されていたが (非特許文献5)、生体内のリガンドも機能も知られていないオーファンGPCRであった。最近、リラキシン-3がSALPRのリガンドでもあること、さらにSALPRは視床下部の室傍核と視索上核に存在することが報告された (特許文献4、非特許文献6)。リラキシン-3は脳内の橋と呼ばれる領域に存在することが報告されており (非特許文献3)、リラキシン-3が中枢性に何らかの機能を発揮している可能性は考えられていたが、これまでにリラキシン-3が摂食を調節するか否かについては知られていなかった。また、摂食と体重増加とは必ずしも相関するとは限らないため、リラキシン-3が体重調節に関与するか否かについては知られていなかった。

【0007】

【特許文献1】国際公開第01/068862号パンフレット

【特許文献2】特開2002-345468号明細書

【特許文献3】国際公開第00/24891パンフレット

【特許文献4】国際公開第2004/082598パンフレット

【非特許文献1】Spiegelmanら、Cell, 104, p. 541-543, 2001

【非特許文献2】Bathgateら、J. Biol. Chem., 277, p. 1148-1157, 2002

【非特許文献3】Sinnayahら、Endocrinology, 140, p. 5082-5086, 1999

【非特許文献4】Sudoら、J. Biol. Chem., 278, p. 7855-7862, 2003

【非特許文献5】Matsumotoら、Gene, 248, p. 183-189, 2000

【非特許文献6】Liuら、J. Biol. Chem., 278, p. 50754-50764, 2003

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、有用な摂食亢進作用および体重増加作用を有するポリペプチド、該ポリペプチドを含有する体重増加を必要とする疾患の治療剤、該ポリペプチドの受容体の賦活化、抑制化をする化合物、物質もしくはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、あるいは該ポリペプチドの発現を阻害する物質などを含有してなる摂食抑制剤、抗肥満剤または糖尿病治療薬などに関する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、リラキシナー3をラット脳室内に投与し、投与後の摂食量を観察することにより、リラキシナー3が摂食亢進作用を有することを見出した。また、ラットにリラキシナー3を単回投与した後に、当該ラットから採取した血液を測定した結果、体脂肪増加の指標として知られるレプチン濃度が血液中で上昇していることを見出した。さらに、ラット脳室内へリラキシナー3の持続投与を行なったところ、リラキシナー3投与群ではvehicle投与群に比べて有意な摂餌量の増加と体重増加作用が認められた。リラキシナー3の持続投与によって両群において運動量に差はなかった。これらのことから、リラキシナー3は摂食亢進作用と共に体重増加作用も有することが初めて明らかとなった。以上よりリラキシナー3は肥満作用を有するポリペプチドであると考えられる。本発明はこれらの知見に基づいて達成されたものである。

【0010】

すなわち、本発明は

(1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩を含有してなる摂食亢進剤。

(2) 次の工程；被験物質を、

(A) リラキシナー3受容体、リラキシナー3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

(B) リラキシナー3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする摂食を亢進する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(3) 次の工程；

配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A) リラキシナー3受容体、リラキシナー3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

を含むことを特徴とする摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(4) 次の工程；

(B) リラキシナー3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする前記(3)に記載の摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(5) リラキシナー3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴とする前記(2)～(4)のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

(6) SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする前記(5)に記載のスクリーニング方法。

(7) 次の工程；被験物質を、

(A) リラキシナー3受容体、リラキシナー3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

(B) リラキシナー3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、

を含むことを特徴とする摂食を亢進する化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(8) 次の工程；

配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、

および被験物質を、

(A) リラキシニン-3 受容体、リラキシニン-3 受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、
を含むことを特徴とする摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(9) 次の工程；

(B) リラキシニン-3 受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする前記 (8) に記載の摂食を亢進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(10) リラキシニン-3 受容体が、SALPR またはその部分ポリペプチドであることを特徴とする前記 (7) ~ (9) のいずれか一項に記載のスクリーニングキット。

(11) SALPR が、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする (10) に記載のスクリーニングキット。

(12) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩を含有してなる体重増加を必要とする疾患の治療剤。

(13) 疾患が拒食症である前記 (12) に記載の治療剤。

(14) 次の工程；被験物質を、

(A) リラキシニン-3 受容体、リラキシニン-3 受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

(B) リラキシニン-3 受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする体重増加作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(15) 次の工程；

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、
および被験物質を、

(A) リラキシニン-3 受容体、リラキシニン-3 受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、
を含むことを特徴とする体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(16) 次の工程；

(B) リラキシニン-3 受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする前記 (15) に記載の体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(17) リラキシニン-3 受容体が、SALPR またはその部分ポリペプチドであることを特徴とする前記 (14) ~ (16) のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

(18) SALPR が、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする前記 (17) に記載のスクリーニング方法。

(19) 次の工程；被験物質を、

(A) リラキシニン-3 受容体、リラキシニン-3 受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、

(B) リラキシニン-3 受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、
を含むことを特徴とする体重増加作用を有する化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(20) 次の工程；

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に

関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその塩、および被験物質を、

(A) リラキシン-3受容体、リラキシン-3受容体を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に接触させる工程、を含むことを特徴とする体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(21) 次の工程；

(B) リラキシン-3受容体を介した細胞刺激活性を測定する工程、を含むことを特徴とする前記(20)に記載の体重を増加または減少させる化合物またはその塩のスクリーニングキット。

(22) リラキシン-3受容体が、SALPRまたはその部分ポリペプチドであることを特徴とする前記(19)～(21)のいずれか一項に記載のスクリーニングキット。

(23) SALPRが、配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする前記(22)に記載のスクリーニングキット。

(24) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドの発現を阻害するアンチセンス核酸、リボザイムまたは2本鎖RNA、あるいは前記ポリペプチドの抗体を含有してなる摂食抑制剤。

(25) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、その機能的に等価な改変ポリペプチドもしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドの発現を阻害するアンチセンス核酸、リボザイムまたは2本鎖RNA、あるいは前記ポリペプチドの抗体を含有してなる抗肥満剤または糖尿病治療剤。
などに関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

リラキシン-3 (relaxin-3)

本発明で使用する「リラキシン-3」とは、遺伝子配列のデータベースから新たに同定されたリラキシン-3 (Relaxin-3) / INSL7 (GenBankアクセッション番号NM_080864) と称せられているポリペプチドであり (J. Biol.

Chem. 277, 1148-1157 (2002))、(i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、を意味する。また、リラキシン-3には、(ii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと機能的に等価な改変ポリペプチド、(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる相同ポリペプチドが含まれる。本発明に使用するリラキシン-3としては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」が好ましい。なお、前記ポリペプチドには、ポリペプチドの塩が含まれ、さらには糖鎖を有しないものと糖鎖を有するものと両方が含まれる。

【0012】

ここで、機能的に等価な改変ポリペプチド（以下、「改変ポリペプチド」と称する）とは、そのアミノ酸配列が、配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドにおいて1または複数個（好ましくは1または数個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列であって、しかもリラキシン-3と実質的に同じ活性〔例えばリラキシン-3受容体との結合能およびそれにより生じる種々の細胞刺激活性（例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位変化、細胞膜近傍pH変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosおよびc-junの誘導活性、アラキドン酸遊離など）、または摂食を亢進する作用〕を有するポリペプチドを意味する。ここで、欠失、置換、挿入および／または付加されてもよいアミノ酸の数は、例えば1～30個、好まし

くは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、特に好ましくは1～2個である。なお、前記改変ポリペプチドには、改変ポリペプチドの塩が含まれ、さらには糖鎖を有しないものと糖鎖を有するものとの両方が含まれる。従って、これらの条件を満たす限り、前記改変ポリペプチドの起源は、ヒトに限定されない。例えばヒト以外の生物〔例えば非ヒト哺乳動物（例えばマウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど）、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など〕由来のリラキシニン-3もしくはその変異体が含まれる。

【0013】

上述の相同ポリペプチドとは、リラキシニン-3のアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる限り、特に限定されるものではないが、リラキシニン-3に関して、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上、そして最も好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアミノ酸配列であって、しかもリラキシニン-3と実質的に同じ活性（例えばリラキシニン-3受容体との結合能およびそれにより生じる種々の細胞刺激活性、または摂食を亢進する作用）を有するポリペプチドを意味する。ここで、「相同性」の数値はいずれも、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であればよく、例えば全米バイオテクノロジー情報センター（NCBI）の相同性アルゴリズムBLAST（Basic local alignment search tool）<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>においてデフォルト（初期設定）のパラメーターを用いることにより、算出することができる。なお、前記相同ポリペプチドには、相同ポリペプチドの塩が含まれ、さらには糖鎖を有しないものと糖鎖を有するものとの両方が含まれる。従って、これらの条件を満たす限り、前記相同ポリペプチドの起源は、ヒトに限定されない。例えばヒト以外の生物〔例えば非ヒト哺乳動物（例えばマウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど）、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など〕由来のリラキシニン-3もしくはその変異体が含まれる。

【0014】

なお、変異体とは、「variation」、すなわち、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

【0015】

これら本発明に使用するリラキシニン-3（すなわち、リラキシニン-3、改変ポリペプチド、相同ポリペプチド）は、種々の公知の方法、例えば遺伝子工学的手法、合成法などによって得ることができる。具体的には、遺伝子工学的手法の場合、リラキシニン-3をコードするポリヌクレオチドを適当な宿主細胞に導入し、得られた形質転換体から発現可能な条件下で培養し、発現タンパク質の分離および精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から所望のポリペプチドを分離および精製することによって調製することができる。また、合成法の場合は、液相法、固相法など常法に従い合成することが可能であり、通常、自動合成機を利用することができる。化学修飾物の合成は常法により行なうことができる。また、使用するポリペプチドは配列番号2の全長および一部でも良く、システイン間の架橋や、N末端環状グルタミン化、C末端アミド化等、分泌タンパクのプロセッシングを受けた形のポリペプチドでも良い。

【0016】

リラキシニン-3をコードするポリヌクレオチド

本発明に使用するリラキシニン-3をコードするポリヌクレオチドは、本発明に使用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである限り、特に限定されるものではない。なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNAおよびRNAの両方が含まれる。本発明に使用するポリヌクレオチドには、具体的には下記の（a）～（e）からなる群より選択されるものが挙げられる。

（a）配列番号1で表される塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；

（b）「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」をコードする、ポリ

ヌクレオチド；

(c) 「配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、前記のリラキシナー 3 と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 「配列番号 2 で表されるアミノ酸配列の 1 または複数個（好ましくは 1 または数個）の箇所において、1 または複数個（好ましくは 1 または数個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、前記のリラキシナー 3 と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；および

(e) 「配列番号 1 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記のリラキシナー 3 と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチドに関する。

【0017】

本発明の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号 2 で表されるアミノ酸配列の 1 または複数個（好ましくは 1 または数個）の箇所において、1 または複数個（好ましくは 1 または数個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、前記のリラキシナー 3 と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。ここで、欠失、置換、挿入および／または付加されてもよいアミノ酸の数は、例えば 1～30 個、好ましくは 1～20 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個、特に好ましくは 1～2 個である。

【0018】

本発明の別の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号 1 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記のリラキシナー 3 と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。

【0019】

ここで、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドとは、具体的には、FASTA、BLAST、Smith-Waterman [Meth. Enzym., 164, 765 (1988)] 等の相同性検索ソフトウェアにより、デフォルト（初期設定）のパラメーターを用いて計算したときに、配列番号 1 で表される塩基配列と少なくとも 70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 85% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、さらにより好ましくは 95% 以上、特に好ましくは 98% 以上、そして最も好ましくは 99% 以上の相同性を有するポリヌクレオチドが挙げられる。また、「ストリンジェントな条件下」とは、当業者が通常使用し得るハイブリダイゼーション緩衝液中で、温度が 40℃～70℃、好ましくは 60℃～65℃などで反応を行い、塩濃度が 15～300 mmol/L、好ましくは 15～60 mmol/L などの洗浄液中で洗浄する方法に従って行なうことができる。温度、塩濃度は使用するプローブの長さに応じて適宜調整することが可能である。

【0020】

本発明に使用するポリヌクレオチドは、例えば天然由来のものであることもできるし、または全合成したものであることもできる。さらには、天然由来のものの一部を利用して合成を行なったものであることもできる。本発明に使用するポリヌクレオチドの典型的な取得方法としては、例えば市販のライブラリーまたは cDNA ライブラリーから、遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば部分アミノ酸配列（例えば配列番号 2 で表されるアミノ酸配列）の情報を基にして作成した適当な DNA プローブを用いてスクリーニングを行なう方法などを挙げることができる。

【0021】

本発明に使用するポリヌクレオチドとしては、「配列番号 1 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド」が好ましい。配列番号 1 で表される塩基配列は、1 番目～3 番目の ATG で始まり、427 番目～429 番目の TAG で終了するオープンリーディングフレームを有する。

【0022】

本発明に使用するリラキシナー 3 は、摂食亢進剤として食欲不振などの治療、体重増加を必要とする疾患の治療、リラキシナー 3 またはリラキシナー 3 をコードするポリヌクレオチドの異常等に起因する疾患の治療の医薬として用いることができる。また、疾患の発症もしくは疾患の治療（例えば術中、術後）に伴い減少した摂食（もしくは食欲）および／または体重の回復を目的とする治療の医薬として用いることもできる。前記疾患は、例えば消化管の運動もしくは機能に係る疾患（例えば下痢、便秘、機能性便秘症、過敏性腸症候群、消化管検査時または手術前後における腸管内容物排除のための排便促進など）、免疫機能調節に係る疾患（例えば慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、腎疾患、強皮症、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、多発性硬化症、リウマチ性間質性肺炎、サルコイドーシス、クローン病、炎症性大腸炎、肝硬変、慢性肝炎、劇症肝炎、脳脊髄炎、重症筋無力症など）、またはエネルギー代謝に係る疾患（例えば糖尿病、耐糖能障害、ケトosis、アシドーシス、糖尿病性神経障害、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、高脂血症、動脈硬化、狭心症、心筋梗塞、肥満、肥満症、摂食障害、拒食症など）などが挙げられる。好ましくは、拒食症が挙げられる。

【0023】

当該ポリペプチドを単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることもできる。この時の有効成分の担体に対する割合は、1～90重量%の間で変動され得る。また、かかる薬剤は、ヒトまたはヒト以外の生物〔例えば非ヒト哺乳動物（例えばウシ、サル、トリ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど）、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など〕に、種々の形態、経口または非経口（例えば静脈注射、筋肉注射、皮下投与、直腸投与、経皮投与）のいずれかの投与経路で投与することができる。従って、本発明のリラキシナー 3 を含有する医薬組成物は、投与経路に応じて適当な剤形とされ、具体的には錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口剤、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口剤を挙げることができる。これらの製剤は通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤等を用いて常法により製造することができる。使用可能な無毒性の上記添加剤としては、例えば乳糖、果糖、ブドウ糖、デンプン、ゼラチン、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、またはその塩、エタノール、クエン酸、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

【0024】

それらの投与形態としては、また、必要な投与量範囲は、ポリペプチドの選択、投与対象、投与経路、製剤の性質、患者の状態、そして医師の判断に左右される。しかし、適当な投与量は患者の体重 1 kg あたり例えば約 0.1～500 μ g、好ましくは約 0.1～100 μ g、より好ましくは 1～50 μ g 程度を投与するのが好ましい範囲である。投与経路の効率が異なることを考慮すれば、必要とされる投与量は広範に変動することが予測される。例えば経口投与は静脈注射による投与よりも高い投与量を必要とすると予想される。こうした投与量レベルの変動は、当業界でよく理解されているような、標準的経験的な最適化手順を用いて調整することができる。

【0025】

リラキシナー 3 受容体を用いた摂食調節に係る化合物のスクリーニング方法

本発明に使用するリラキシナー 3 に対する受容体としては、種々の受容体のうち、本発明に使用するリラキシナー 3 と結合活性を有し、リラキシナー 3 受容体発現細胞の細胞刺激活性（例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位変化、細胞膜近傍 pH 変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos および c-jun の誘導活性、アラキドン酸遊離など）を有するものを使用することができる。

【0026】

具体的には、リラキシナー 3 受容体として、報告されている公知の受容体、例えば LGR7 (GenBank アクセッション番号 NM_021634)、SALPR (GenB

a n kアクセッション番号NM__016568) (GPCR135とも称されている。) またはGPR100 (GenBankアクセッション番号AB__083593) (hGPCR11、GPCR142とも称されている。) などを使用することが可能である。また、これら受容体の部分ポリペプチドとして後述のスクリーニング方法に使用可能であれば特に限定されず、例えばリラキシン-3に対する結合能を有する部分ポリペプチド、細胞膜外領域に相当するアミノ酸配列を含む部分ポリペプチドなども使用することもできる。

【0027】

以下、本明細書においては、本発明の好ましい一例として、SALPRを使用するスクリーニング方法について本発明の内容を詳述する。すなわち、本発明は、SALPRまたはその部分ポリペプチドに結合し、摂食調節（摂食を促進または抑制する）に係る化合物のスクリーニング方法を提供するものである。また、SALPRまたはその部分ポリペプチドに被験物質を作用させ、細胞刺激活性を測定することにより、該被験物質に摂食を促進または抑制する作用を有するか否かを決定することができる。

【0028】

ここで、本発明に使用するSALPRまたはその部分ポリペプチドは、種々の公知の方法により得ることができ、例えばSALPRをコードするポリヌクレオチド (GenBankアクセッション番号NM__016568) を用いて公知の遺伝子工学的的手法により調製することができる。また別の態様として、公知のポリペプチドの合成法により得ることができ、例えば液相法、固相法など常法に従い合成することが可能であり、通常、自動合成機を利用することができる。さらに、別の態様によれば、SALPRの部分ポリペプチドは、SALPRを適当なタンパク質分解酵素で切断することによって調製することができる。

【0029】

以下、遺伝子工学的的手法について、より具体的にはSALPRを使用する場合について詳述するが、その部分ポリペプチドについても後述のスクリーニング方法に使用可能であれば特に限定されない。SALPRをコードするポリヌクレオチドを適当な宿主細胞に導入し、得られた形質転換体から発現可能な条件下で培養し、発現タンパク質の分離および精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から所望のポリペプチドを分離および精製することにより調製することができる。前記の分離および精製方法としては、例えば硫酸塩析、イオン交換セルロースを用いるイオン交換カラムクロマトグラフィー、分子篩ゲルを用いる分子篩カラムクロマトグラフィー、プロテインA結合多糖類を用いる親和性カラムクロマトグラフィー、透析、または凍結乾燥等を挙げることができる。

【0030】

前記のSALPRをコードするポリヌクレオチドは、SALPRをコードする限り、特に限定されるものではなく、例えば配列番号3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。配列番号3で表される前記ポリヌクレオチドは、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるSALPRをコードする。

【0031】

前記形質転換に使用されるプラスミドは、SALPRをコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、当該ポリヌクレオチドを挿入することにより得られるプラスミドを挙げることができる。

【0032】

また、前記形質転換体も、SALPRをコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば当該ポリヌクレオチドが宿主細胞の染色体に組み込まれた形質転換体であることもできるし、あるいは、当該ポリヌクレオチドを含むプラスミドの形で含有する形質転換体であることもできるし、あるいは、SALPRを発現していない形質転換体であることもできる。当該形質転換体は、例えば前記プラスミドにより、あるいは、前記ポリヌクレオチドそれ自体により、所望の宿主細胞を形質転換することにより得ることができる。

【0033】

前記宿主細胞としては、例えば通常使用される公知の微生物、例えば大腸菌（例えば *Escherichia coli* JM109 株）または酵母（例えば *Saccharomyces cerevisiae* W303 株）、あるいは、公知の培養細胞、例えば動物細胞（例えば CHO 細胞、HEK-293 細胞、または COS 細胞）または昆虫細胞（例えば BmN4 細胞）を挙げることができる。

【0034】

また、公知の前記発現ベクターとしては、例えば大腸菌に対しては、pUC、pTV、pGEX、pKK、または pTrcHis を；酵母に対しては、pEMBL Y または pYES2 を；CHO 細胞、HEK-293 細胞および COS 細胞に対しては、pcDNA3、pMAMneo または pBabePuro を；BmN4 細胞に対しては、カイコ核多角体ウイルス（BmNPV）のポリヘドリンプロモーターを有するベクター（例えば pBK283）を挙げることができる。

【0035】

SALPR を含有する細胞は、SALPR を細胞膜表面に発現している限り、特に限定されるものではなく、例えば前記形質転換体（すなわち、SALPR をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドで形質転換された細胞）を、SALPR の発現が可能な条件下で培養することにより得ることもできるし、あるいは、適当な細胞に、SALPR をコードする RNA を注入し、SALPR の発現が可能な条件下で培養することにより得ることもできる。

【0036】

また、SALPR を含有する本発明に使用する細胞膜画分は、例えば本発明による SALPR を発現する細胞を破碎した後、細胞膜が多く含まれる画分を分離することにより得ることができる。細胞の破碎方法としては、例えばホモジナイザー（例えば Potter-Elvehjem 型ホモジナイザー）で細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーまたはポリトロン（Kinematica 社）による破碎、超音波による破碎、あるいは、フレンチプレスなどで加圧しながら細いノズルから細胞を噴出させることによる破碎などを挙げることができる。また、細胞膜の分画方法としては、例えば遠心力による分画法、例えば分画遠心分離法または密度勾配遠心分離法を挙げることができる。

【0037】

SALPR に対する、本発明による摂食を促進または抑制する化合物のスクリーニング方法では、SALPR もしくは前記細胞膜画分（すなわち、SALPR を含有する細胞膜画分）、または前記細胞（すなわち、SALPR を含有する細胞）を用いることができる。

【0038】

また、本発明によるスクリーニング方法においては、被験物質が SALPR に特異的に結合するか否かを調べる方法と、SALPR に被験物質が結合することにより生じる細胞刺激活性（例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位変化、細胞膜近傍 pH 変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos および c-jun の誘導活性、アラキドン酸遊離など）を調べる方法とが挙げられ、それらを利用することができる。

【0039】

本発明によるスクリーニング方法においては、例えば SALPR もしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、被験物質とを接触させ、SALPR もしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、被験物質が結合するか否かを分析することにより、SALPR に対する摂食を促進または抑制する能力に関わらずスクリーニングすることができる。

【0040】

具体的には、被験物質非存在下および被験物質存在下の各条件下において、SALPR もしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、標識した天然のリガンド（すなわち、リラキシン-3）とを接触させ、前記条件下における SALPR もしくは前記細胞膜画分または

前記細胞に対する前記天然リガンドの特異的結合量を比較することにより、SALPR に対する摂食を促進または抑制する能力に関わらずスクリーニングすることができる。すなわち、前記被験物質が、SALPR に対する摂食を促進または抑制する能力を有する場合には、被験物質非存在下における SALPR もしくは前記細胞膜画分または前記細胞に対する天然リガンドの特異的結合量に対して、被験物質存在下における前記特異的結合量が低下する。

【0041】

本発明によるスクリーニング方法において、SALPR もしくは前記細胞膜画分または前記細胞に対する前記天然リガンドの特異的結合量を比較する場合には、前記天然リガンドとして、標識した天然リガンドを用いることができる。前記指標としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などを用いることができる。前記酵素としては、例えば β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼなどを用いることができる。蛍光物質としては、例えばフルオレセイン、ルシゲニンなどを用いることができる。発光物質としてはルシフェリン、ルシゲニンなどを用いることができる。場合によっては、天然リガンドと標識物質を結合させるためにビオチン-アビジンの系を用いることもできる。

【0042】

このように、本発明によるスクリーニング方法において、SALPR もしくは前記細胞膜画分または前記細胞に結合して、これらと天然リガンドとの結合を阻害する被験物質を、SALPR に対する摂食を促進または抑制する能力に関わらずスクリーニングすることができる。

【0043】

本発明によるスクリーニング方法における別の態様では、被験物質非存在下および被験物質存在下の各条件下において、前記細胞と標識化した天然のリガンド（すなわち、リラキシン-3）とを接触させ、前記各条件下における前記細胞に対する前記天然リガンドの特異的結合量を比較し、さらに、前記条件下における前記天然リガンドの特定の細胞刺激活性を比較することにより、SALPR に対する摂食を促進または抑制する能力を区別してスクリーニングすることができる。

【0044】

前記態様においては、前記細胞に結合し、前記細胞に含まれる受容体を介して細胞刺激活性を有する被験物質を、SALPR に対する摂食を促進する物質として選択することができる。

【0045】

一方、前記態様において、前記細胞と天然リガンドとの結合を阻害するものの、細胞刺激活性を有しない被験物質を、SALPR に対する摂食を抑制する物質として選択することができる。

【0046】

本発明によるスクリーニング方法は、細胞刺激活性として、例えばアデニル酸シクラーゼの活性抑制を利用することによって実施することができる。

【0047】

この態様のスクリーニング方法においては、例えばアデニル酸シクラーゼの活性化によって細胞内に生成する cAMP を公知の手法で測定すればよく、SALPR に対する摂食を促進または抑制する能力を区別してスクリーニングすることができる。この態様は、SALPR に天然リガンドが結合することにより生じる細胞内シグナル伝達、すなわち、SALPR の細胞刺激活性の一つであるアデニル酸シクラーゼの活性抑制を利用するものである。具体的には、SALPR に天然リガンドが結合すると、SALPR に共役している Gタンパク質ファミリーの一つである Gi ファミリーが、アデニル酸シクラーゼを抑制し、細胞内に生成されるサイクリック AMP（cAMP：アデニル酸シクラーゼにより ATP から生成される）量を減少させることによる。

【0048】

例えばSALPRを細胞膜上に発現（好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入し過剰に発現）した哺乳動物由来細胞（例えばHEK-293細胞もしくはCHO細胞）にアデニル酸シクラーゼの活性化剤［例えばフォルスコリン（FSK）］を添加すると、細胞内のcAMPの濃度が上昇する。

【0049】

また、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を添加する際に、SALPRの天然リガンドを加えると、アデニル酸シクラーゼ活性化剤に起因する前記のアデニル酸シクラーゼ活性促進に加え、前記天然リガンドが本発明によるSALPRに作用して生じるアデニル酸シクラーゼの活性抑制も起こるため、結果として、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独投与した場合に比べて、cAMPの生成量が減少する。従って、摂食を促進する作用を有する物質をスクリーニングする場合には、このスクリーニング系でSALPRに対する天然のリガンドに代わり、被験物質を単独で接触させてcAMPの生成量を減少させる（すなわち天然リガンドと同様の作用を有する）物質を選択すると良い。

【0050】

摂食を抑制する作用を有する物質をスクリーニングする場合には、アデニル酸シクラーゼ活性化剤、SALPRの天然リガンド、および被験物質をスクリーニング用細胞に添加するとよい。アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独で添加した場合に比べて、天然リガンドの作用でcAMPの生成量が減少するが、被験物質が天然リガンドの作用に拮抗する場合には、cAMP生成量の減少を抑制する。このときには、前記被験物質は摂食抑制作用を有する物質として選択できる。

【0051】

細胞内cAMP量を測定する方法としては、例えばイムノアッセイ等があるが、例えば市販のcAMP定量キットを使用することもできる。

【0052】

別の態様のスクリーニング方法においては、例えばSALPRを細胞膜上に発現（好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入し過剰に発現）し、しかも、cAMP応答配列（CRE）が5'上流に位置するレポーター遺伝子（例えばアルカリフォスファターゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、ベータラクタマーゼ遺伝子、ニトロレダクターゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、ベータガラクトシダーゼ遺伝子等、またはGFP（Green Fluorescent Protein）等の蛍光タンパク質遺伝子等）を含有する細胞（以下、「スクリーニング用細胞」と称することもある）を用いることにより、SALPRに対する摂食を促進または抑制する能力を区別してスクリーニングすることができる。この態様は、前述のcAMPの生成が減少するとその結果、前記スクリーニング用細胞に導入されているCREをプロモーター領域に有するレポーター遺伝子の転写が抑制されることを利用している。

【0053】

以下、前記態様による、SALPRに対する摂食を促進または抑制する能力を区別してスクリーニングする手順について、より具体的に説明する。

すなわち、前記スクリーニング用細胞に導入されているCREは、細胞内のcAMPの濃度が上昇すると発現が亢進する遺伝子群（cAMP誘導性遺伝子）の転写調節領域に共通して存在する塩基配列である。従って、アデニル酸シクラーゼの活性化剤（例えばFSK）をスクリーニング用細胞に添加すると、細胞内のcAMPの濃度が上昇し、その結果、CREの下流に位置するレポーター遺伝子の発現量が増加する。レポーター遺伝子産物の発現量は、レポーター遺伝子産物と反応し基質から生成した発光物質の量に由来する発光を測定することによりもしくはレポーター遺伝子として産生された蛍光タンパク質由来の蛍光を測定することで容易に測定することが可能である。

【0054】

また、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を添加する際に、SALPRの天然リガンドを加えると、アデニル酸シクラーゼ活性化剤に起因する前記のアデニル酸シクラーゼ活性促進

に加え、前記天然リガンドが本発明によるSALPRに作用して生じるアデニル酸シクラーゼの活性抑制も起こるため、結果として、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独投与した場合に比べて、レポーター遺伝子産物の発現量が低下する。従って、摂食を促進する作用を有する物質をスクリーニングする場合には、このスクリーニング系で、SALPRに対する天然のリガンドに代わり被験物質を単独で接触させてレポーター遺伝子産物の発現量を減少させる（すなわち天然リガンドと同様の作用を有する）物質を選択すると良い。

【0055】

摂食を抑制する作用を有する物質をスクリーニングする場合には、アデニル酸シクラーゼ活性化剤、SALPRの天然リガンド、および被験物質をスクリーニング用細胞に添加するとよい。アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独で添加した場合に比べて、天然リガンドの作用でレポーター遺伝子産物の発現量は減少するが、被験物質が天然リガンドの作用に拮抗する場合には、レポーター遺伝子産物の発現減少を抑制する。このときには、前記被験物質は摂食抑制作用を有する物質として選択できる。

【0056】

被験物質による作用が、SALPRに対する結合を介した作用であるか否かは、簡単に確認することができる。例えばスクリーニング用細胞（すなわち、SALPRを細胞膜上に発現し、しかも、CREが5'上流に位置するレポーター遺伝子を含む細胞）を用いた前記試験と並行して、コントロール用細胞（例えばCREが5'上流に位置するレポーター遺伝子を含むものの、SALPRを細胞膜上に発現していない細胞）を用いて同様の試験を実施する。その結果、前記被験物質による作用が、SALPRに対する結合による作用でない場合には、スクリーニング用細胞およびコントロール用細胞でレポーター遺伝子産物の発現量に関して同じ現象が観察されるのに対して、前記被験物質による作用が、SALPRに対する結合による作用である場合には、スクリーニング用細胞とコントロール用細胞とでレポーター遺伝子産物の発現量に関して異なる現象が観察される。

【0057】

また、別の態様として、被験物質をヒトまたはヒト以外の生物〔例えば非ヒト哺乳動物（例えばウシ、サル、トリ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど）、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など〕に投与し、投与後の摂食量等の指標を解析することにより摂食調節に影響を与える被験物質を確認および決定することができる。上記哺乳動物としては、正常の動物に限らず、遺伝性の病態モデル動物（例えば肥満病モデルであるob/obマウス、db/dbマウスなど）や遺伝子改変動物でもよい。被験物質の投与形態としては経口的または非経口的に投与する。非経口的な投与経路の様態としては、例えば静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、気道内、直腸内、脳内、好ましくは視床下部近傍の脳室内投与が挙げられる。スクリーニングのための指標としては摂食量のほかにも、例えば体重、運動量、エネルギー代謝量、血中の糖および脂質の量等を測定することも有効である。また、投与の際に絶食もしくは飽食、さらに脂肪過剰食等の条件を課すこともできる。

被験物質の投与回数は1日あたり一回でも数回に分けても良く、被験物質を投与する期間や観察する期間は1日から数週間にわたってもよい。

【0058】

リラキシン-3受容体を用いた体重調節に係る化合物のスクリーニング方法

本発明に使用するリラキシン-3に対する受容体としては、種々の受容体のうち、本発明に使用するリラキシン-3と結合活性を有し、リラキシン-3受容体発現細胞の細胞刺激活性（例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位変化、細胞膜近傍pH変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosおよびc-junの誘導活性、アラキドン酸遊離など）を有するものを使用することができる。

【0059】

具体的には、リラキシン-3受容体として、報告されている公知の受容体、例えばLGR7（GenBankアクセッション番号NM_021634）、SALPR（GenB

ank アクセション番号 NM_016568) (GPCR135とも称されている。) または GPR100 (GenBank アクセション番号 AB_083593) (hGPCR11、GPCR142とも称されている。) などを使用することが可能である。また、これら受容体の部分ポリペプチドとして後述のスクリーニング方法に使用可能であれば特に限定されず、例えばリラキシナー 3 に対する結合能を有する部分ポリペプチド、細胞膜外領域に相当するアミノ酸配列を含む部分ポリペプチドなども使用することもできる。

【0060】

以下、本明細書においては、本発明の好ましい一例として、SALPR を使用するスクリーニング方法について本発明の内容を詳述する。すなわち、本発明は、SALPR またはその部分ポリペプチドに結合し、体重調節（体重を増加または減少する）に係る化合物のスクリーニング方法を提供するものである。また、SALPR またはその部分ポリペプチドに被験物質を作用させ、細胞刺激活性を測定することにより、該被験物質に体重を増加または減少する作用を有するか否かを決定することができる。

【0061】

ここで、本発明に使用する SALPR またはその部分ポリペプチドは、種々の公知の方法により得ることができ、例えば SALPR をコードするポリヌクレオチド (GenBank アクセション番号 NM_016568) を用いて公知の遺伝子工学的的手法により調製することができる。また別の態様として、公知のポリペプチドの合成法により得ることができ、例えば液相法、固相法など常法に従い合成することが可能であり、通常、自動合成機を利用することができる。さらに、別の態様によれば、SALPR の部分ポリペプチドは、SALPR を適当なタンパク質分解酵素で切断することによって調製することができる。

【0062】

以下、遺伝子工学的的手法について、より具体的には SALPR を使用する場合について詳述するが、その部分ポリペプチドについても後述のスクリーニング方法に使用可能であれば特に限定されない。SALPR をコードするポリヌクレオチドを適当な宿主細胞に導入し、得られた形質転換体から発現可能な条件下で培養し、発現タンパク質の分離および精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から所望のポリペプチドを分離および精製することにより調製することができる。前記の分離および精製方法としては、例えば硫酸塩析、イオン交換セルロースを用いるイオン交換カラムクロマトグラフィー、分子篩ゲルを用いる分子篩カラムクロマトグラフィー、プロテイン A 結合多糖類を用いる親和性カラムクロマトグラフィー、透析、または凍結乾燥等を挙げることができる。

【0063】

前記の SALPR をコードするポリヌクレオチドは、SALPR をコードする限り、特に限定されるものではなく、例えば配列番号 3 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。配列番号 3 で表される前記ポリヌクレオチドは、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる SALPR をコードする。

【0064】

前記形質転換に使用されるプラスミドは、SALPR をコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、当該ポリヌクレオチドを挿入することにより得られるプラスミドを挙げることができる。

【0065】

また、前記形質転換体も、SALPR をコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば当該ポリヌクレオチドが宿主細胞の染色体に組み込まれた形質転換体であることもできるし、あるいは、当該ポリヌクレオチドを含むプラスミドの形で含有する形質転換体であることもできるし、あるいは、SALPR を発現していない形質転換体であることもできる。当該形質転換体は、例えば前記プラスミドにより、あるいは、前記ポリヌクレオチドそれ自体により、所望の宿主細胞を形質転換することにより得ることができる。

【0066】

前記宿主細胞としては、例えば通常使用される公知の微生物、例えば大腸菌（例えば *Escherichia coli* JM109株）または酵母（例えば *Saccharomyces cerevisiae* W303株）、あるいは、公知の培養細胞、例えば動物細胞（例えばCHO細胞、HEK-293細胞、またはCOS細胞）または昆虫細胞（例えばBmN4細胞）を挙げることができる。

【0067】

また、公知の前記発現ベクターとしては、例えば大腸菌に対しては、pUC、pTV、pGEX、pKK、またはpTrcHisを；酵母に対しては、pEMBL YまたはpYES2を；CHO細胞、HEK-293細胞およびCOS細胞に対しては、pcDNA3、pMAMneoまたはpBabePuroを；BmN4細胞に対しては、カイコ核多角体ウイルス（BmNPV）のポリヘドリンプロモーターを有するベクター（例えばpBK283）を挙げることができる。

【0068】

SALPRを含有する細胞は、SALPRを細胞膜表面に発現している限り、特に限定されるものではなく、例えば前記形質転換体（すなわち、SALPRをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドで形質転換された細胞）を、SALPRの発現が可能な条件下で培養することにより得ることもできるし、あるいは、適当な細胞に、SALPRをコードするRNAを注入し、SALPRの発現が可能な条件下で培養することにより得ることもできる。

【0069】

また、SALPRを含有する本発明に使用する細胞膜画分は、例えば本発明によるSALPRを発現する細胞を破碎した後、細胞膜が多く含まれる画分を分離することにより得ることができる。細胞の破碎方法としては、例えばホモジナイザー（例えばPotter-Elvehjem型ホモジナイザー）で細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーまたはポリトロン（Kinematica社）による破碎、超音波による破碎、あるいは、フレンチプレスなどで加圧しながら細いノズルから細胞を噴出させることによる破碎などを挙げることができる。また、細胞膜の分画方法としては、例えば遠心力による分画法、例えば分画遠心分離法または密度勾配遠心分離法を挙げることができる。

【0070】

SALPRに対する、本発明による体重を増加または減少する化合物のスクリーニング方法では、SALPRもしくは前記細胞膜画分（すなわち、SALPRを含有する細胞膜画分）、または前記細胞（すなわち、SALPRを含有する細胞）を用いることができる。

【0071】

また、本発明によるスクリーニング方法においては、被験物質がSALPRに特異的に結合するか否かを調べる方法と、SALPRに被験物質が結合することにより生じる細胞刺激活性（例えば細胞内のカルシウムの遊離、アデニル酸シクラーゼの活性化、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン脂質生成、細胞膜電位変化、細胞膜近傍pH変化、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosおよびc-junの誘導活性、アラキドン酸遊離など）を調べる方法とが挙げられ、それらを利用することができる。

【0072】

本発明によるスクリーニング方法においては、例えばSALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、被験物質とを接触させ、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、被験物質が結合するか否かを分析することにより、SALPRに対する体重を増加または減少する能力に関わらずスクリーニングすることができる。

【0073】

具体的には、被験物質非存在下および被験物質存在下の各条件下において、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞と、標識した天然のリガンド（すなわち、リラキシニン-3）とを接触させ、前記条件下におけるSALPRもしくは前記細胞膜画分または

前記細胞に対する前記天然リガンドの特異的結合量を比較することにより、SALPR に対する体重を増加または減少する能力に関わらずスクリーニングすることができる。すなわち、前記被験物質が、SALPR に対する体重を増加または減少する能力を有する場合には、被験物質非存在下における SALPR もしくは前記細胞膜画分または前記細胞に対する天然リガンドの特異的結合量に対して、被験物質存在下における前記特異的結合量が低下する。

【0074】

本発明によるスクリーニング方法において、SALPR もしくは前記細胞膜画分または前記細胞に対する前記天然リガンドの特異的結合量を比較する場合には、前記天然リガンドとして、標識した天然リガンドを用いることができる。前記指標としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などを用いることができる。前記酵素としては、例えば β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼなどを用いることができる。蛍光物質としては、例えばフルオレセイン、ルシゲニンなどを用いることができる。場合によっては、天然リガンドと標識物質を結合させるためにビオチン-アビジンの系を用いることもできる。

【0075】

このように、本発明によるスクリーニング方法において、SALPR もしくは前記細胞膜画分または前記細胞に結合して、これらと天然リガンドとの結合を阻害する被験物質を、SALPR に対する体重を増加または減少する能力に関わらずスクリーニングすることができる。

【0076】

本発明によるスクリーニング方法における別の態様では、被験物質非存在下および被験物質存在下の各条件下において、前記細胞と標識化した天然のリガンド（すなわち、リラキシン-3）とを接触させ、前記各条件下における前記細胞に対する前記天然リガンドの特異的結合量を比較し、さらに、前記条件下における前記天然リガンドの特定の細胞刺激活性を比較することにより、SALPR に対する体重を増加または減少する能力を区別してスクリーニングすることができる。

【0077】

前記態様においては、前記細胞に結合し、前記細胞に含まれる受容体を介して細胞刺激活性を有する被験物質を、SALPR に対する体重を増加する物質として選択することができる。

【0078】

一方、前記態様において、前記細胞と天然リガンドとの結合を阻害するものの、細胞刺激活性を有しない被験物質を、SALPR に対する体重を減少する物質として選択することができる。

【0079】

本発明によるスクリーニング方法は、細胞刺激活性として、例えばアデニル酸シクラーゼの活性抑制を利用することによって実施することができる。

【0080】

この態様のスクリーニング方法においては、例えばアデニル酸シクラーゼの活性化によって細胞内に生成する cAMP を公知の手法で測定すればよく、SALPR に対する体重を増加または減少する能力を区別してスクリーニングすることができる。この態様は、SALPR に天然リガンドが結合することにより生じる細胞内シグナル伝達、すなわち、SALPR の細胞刺激活性の一つであるアデニル酸シクラーゼの活性抑制を利用するものである。具体的には、SALPR に天然リガンドが結合すると、SALPR に共役している Gタンパク質ファミリーの一つである Giファミリーが、アデニル酸シクラーゼを抑制し、細胞内に生成されるサイクリックAMP（cAMP：アデニル酸シクラーゼにより ATP から生成される）量を減少させることによる。

【0081】

例えばSALPRを細胞膜上に発現（好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入し過剰に発現）した哺乳動物由来細胞（例えばHEK-293細胞もしくはCHO細胞）にアデニル酸シクラーゼの活性化剤［例えばフォルスコリン（FSK）］を添加すると、細胞内のcAMPの濃度が上昇する。

【0082】

また、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を添加する際に、SALPRの天然リガンドを加えると、アデニル酸シクラーゼ活性化剤に起因する前記のアデニル酸シクラーゼ活性促進に加え、前記天然リガンドが本発明によるSALPRに作用して生じるアデニル酸シクラーゼの活性抑制も起こるため、結果として、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独投与した場合に比べて、cAMPの生成量が減少する。従って、体重を増加する作用を有する物質をスクリーニングする場合には、このスクリーニング系でSALPRに対する天然のリガンドに代わり、被験物質を単独で接触させてcAMPの生成量を減少させる（すなわち天然リガンドと同様の作用を有する）物質を選択すると良い。

【0083】

体重を減少する作用を有する物質をスクリーニングする場合には、アデニル酸シクラーゼ活性化剤、SALPRの天然リガンド、および被験物質をスクリーニング用細胞に添加するとよい。アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独で添加した場合に比べて、天然リガンドの作用でcAMPの生成量が減少するが、被験物質が天然リガンドの作用に拮抗する場合には、cAMP生成量の減少を抑制する。このときには、前記被験物質は体重減少作用を有する物質として選択できる。

【0084】

細胞内cAMP量を測定する方法としては、例えばイムノアッセイ等があるが、例えば市販のcAMP定量キットを使用することもできる。

【0085】

別の態様のスクリーニング方法においては、例えばSALPRを細胞膜上に発現（好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入し過剰に発現）し、しかも、cAMP応答配列（CRE）が5'上流に位置するレポーター遺伝子（例えばアルカリフォスファターゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、ベータラクタマーゼ遺伝子、ニトロレダクターゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、ベータガラクトシダーゼ遺伝子等、またはGFP（Green Fluorescent Protein）等の蛍光タンパク質遺伝子等）を含有する細胞（以下、「スクリーニング用細胞」と称することもある）を用いることにより、SALPRに対する体重を増加または減少する能力を区別してスクリーニングすることができる。この態様は、前述のcAMPの生成が減少するとその結果、前記スクリーニング用細胞に導入されているCREをプロモーター領域に有するレポーター遺伝子の転写が抑制されることを利用している。

【0086】

以下、前記態様による、SALPRに対する体重を増加または減少する能力を区別してスクリーニングする手順について、より具体的に説明する。

すなわち、前記スクリーニング用細胞に導入されているCREは、細胞内のcAMPの濃度が上昇すると発現が亢進する遺伝子群（cAMP誘導性遺伝子）の転写調節領域に共通して存在する塩基配列である。従って、アデニル酸シクラーゼの活性化剤（例えばFSK）をスクリーニング用細胞に添加すると、細胞内のcAMPの濃度が上昇し、その結果、CREの下流に位置するレポーター遺伝子の発現量が増加する。レポーター遺伝子産物の発現量は、レポーター遺伝子産物と反応し基質から生成した発光物質の量に由来する発光を測定することによりもしくはレポーター遺伝子として産生された蛍光タンパク質由来の蛍光を測定することで容易に測定することが可能である。

【0087】

また、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を添加する際に、SALPRの天然リガンドを加えると、アデニル酸シクラーゼ活性化剤に起因する前記のアデニル酸シクラーゼ活性促進

に加え、前記天然リガンドが本発明によるSALPRに作用して生じるアデニル酸シクラーゼの活性抑制も起こるため、結果として、アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独投与した場合に比べて、レポーター遺伝子産物の発現量が低下する。従って、体重を増加する作用を有する物質をスクリーニングする場合には、このスクリーニング系で、SALPRに対する天然のリガンドに代わり被験物質を単独で接触させてレポーター遺伝子産物の発現量を減少させる（すなわち天然リガンドと同様の作用を有する）物質を選択すると良い。

【0088】

体重を減少する作用を有する物質をスクリーニングする場合には、アデニル酸シクラーゼ活性化剤、SALPRの天然リガンド、および被験物質をスクリーニング用細胞に添加するとよい。アデニル酸シクラーゼ活性化剤を単独で添加した場合に比べて、天然リガンドの作用でレポーター遺伝子産物の発現量は減少するが、被験物質が天然リガンドの作用に拮抗する場合には、レポーター遺伝子産物の発現減少を抑制する。このときには、前記被験物質は体重減少作用を有する物質として選択できる。

【0089】

被験物質による作用が、SALPRに対する結合を介した作用であるか否かは、簡単に確認することができる。例えばスクリーニング用細胞（すなわち、SALPRを細胞膜上に発現し、しかも、CREが5'上流に位置するレポーター遺伝子を含む細胞）を用いた前記試験と並行して、コントロール用細胞（例えばCREが5'上流に位置するレポーター遺伝子を含むものの、SALPRを細胞膜上に発現していない細胞）を用いて同様の試験を実施する。その結果、前記被験物質による作用が、SALPRに対する結合による作用でない場合には、スクリーニング用細胞およびコントロール用細胞でレポーター遺伝子産物の発現量に関して同じ現象が観察されるのに対して、前記被験物質による作用が、SALPRに対する結合による作用である場合には、スクリーニング用細胞とコントロール用細胞とでレポーター遺伝子産物の発現量に関して異なる現象が観察される。

【0090】

また、別の態様として、被験物質をヒトまたはヒト以外の生物〔例えば非ヒト哺乳動物（例えばウシ、サル、トリ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど）、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など〕に投与し、投与後の体重等の指標を解析することにより体重調節および／または肥満作用に影響を与える被験物質を確認および決定することができる。上記哺乳動物としては、正常の動物に限らず、遺伝性の病態モデル動物（例えば肥満病モデルであるob／obマウス、db／dbマウスなど）や遺伝子改変動物でもよい。被験物質の投与形態としては経口的または非経口的に投与する。非経口的な投与経路の様態としては、例えば静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、気道内、直腸内、脳内、好ましくは視床下部近傍の脳室内投与が挙げられる。スクリーニングのための指標としては体重のほかにも、例えば体内の脂肪量、脂肪率、運動量、エネルギー代謝量、血中の糖および脂質、または、ホルモンの量等を測定することも有効である。また、投与の際に絶食もしくは飽食、さらに脂肪過剰食等の条件を課すこともできる。被験物質の投与回数は1日あたり一回でも数回に分けても良く、被験物質を投与する期間や観察する期間は1日から数週間にわたってもよい。

【0091】

ここで、本発明に使用する被験物質はどのような化合物であってもよいが、例えば遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物ライブラリー、核酸（オリゴDNA、オリゴRNA）、合成ペプチドライブラリー、抗体、細菌放出物質、細胞（微生物、植物細胞、動物細胞）抽出液、細胞（微生物、植物細胞、動物細胞）培養上清、精製または部分精製ポリペプチド、海洋生物、植物または動物等由来の抽出物、土壌、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを挙げることができる。

【0092】

本発明のスクリーニングキットは、SALPRもしくは前記細胞膜画分（すなわち、SALPRを含む細胞膜画分）、または前記細胞（すなわち、SALPRを含む細胞）を含む。前記スクリーニングキットは、所望により、種々の試薬、例えば標識したり

ラキシナー 3、非標識のリラキシナー 3、結合反応用緩衝液、および／または洗浄用緩衝液をさらに含むことができる。

【0093】

具体的には、前記スクリーニングキットは、SALPRもしくは前記細胞膜画分または前記細胞を含み、所望により、標識した天然リガンド（すなわち、リラキシナー 3）、非標識の天然リガンド、および／または結合反応用緩衝液を含むことができる。

【0094】

本発明の別の態様のスクリーニングキットは、SALPRを細胞膜上に発現（好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入して過剰に発現）し、しかも、cAMP応答配列（CRE）が5'上流に位置するレポーター遺伝子を含有する細胞を含み、所望により、アルカリフォスファターゼもしくはルシフェラーゼ等の基質、アデニル酸シクラーゼ活性化剤（例えばFSK）、天然リガンド、および／または結合反応用緩衝液を含むことができる。

【0095】

本発明のさらに別の態様のスクリーニングキットは、SALPRを細胞膜上に発現（好ましくは、SALPRを含む発現ベクターを導入して過剰に発現）し、しかも、cAMP応答配列（CRE）が5'上流に位置するレポーター遺伝子を含有する細胞と、CREが5'上流に位置するレポーター遺伝子を含有するものの、SALPRを細胞膜上に発現していない細胞とを含み、所望により、レポーター遺伝子産物の基質、アデニル酸シクラーゼ活性化剤（例えばFSK）、および／または結合反応用緩衝液を含むことができる。

【0096】

本発明のスクリーニング方法により得られる被験物質は、摂食を促進もしくは抑制する化合物、または体重を増加もしくは減少させる化合物である。当該化合物は塩を形成してもよく、薬学的に許容し得る酸または塩基などとの塩が挙げられる。従って、本発明のスクリーニング方法により得られる被験物質またはその塩は、摂食（もしくは食欲）調節における何らかの異常に起因する疾患の治療、体重調節における何らかの異常に起因する疾患の治療、リラキシナー 3またはリラキシナー 3をコードするポリヌクレオチドの異常に起因する疾患の治療の医薬として用いることができる。また、疾患の発症または疾患の治療（例えば術中、術後）に伴い増加もしくは減少した摂食（もしくは食欲）および／または体重の回復を目的とする治療の医薬として用いることもできる。前記疾患は、例えば消化管の運動もしくは機能に係る疾患（例えば下痢、便秘、機能的便秘症、過敏性腸症候群、消化管検査時または手術前後における腸管内容物排除のための排便促進など）、免疫機能調節に係る疾患（例えば慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、腎疾患、強皮症、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、多発性硬化症、リウマチ性間質性肺炎、サルコイドーシス、クローン病、炎症性大腸炎、肝硬変、慢性肝炎、劇症肝炎、脳脊髄炎、重症筋無力症など）、またはエネルギー代謝に係る疾患（例えば糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病性神経障害、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、高脂血症、動脈硬化、狭心症、心筋梗塞、肥満、肥満症、摂食障害、拒食症など）などが挙げられる。

【0097】

得られた物質を単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることもできる。この時の有効成分の担体に対する割合は、1～90重量%の間で変動され得る。また、かかる薬剤は、ヒトまたはヒト以外の生物（例えば非ヒト哺乳動物（例えばウシ、サル、トリ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど）、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など）に、種々の形態、経口または非経口（例えば静脈注射、筋肉注射、皮下投与、直腸投与、経皮投与）のいずれかの投与経路で投与することができる。従って、本発明のスクリーニング方法により得られる被験物質を含有する医薬組成物は、投与経路に応じて適当な剤形とされ、具体的には錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口剤、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口剤を挙げることができる。これらの製剤は通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、分散

剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤等を用いて常法により製造することができる。使用可能な無毒性の上記添加剤としては、例えば乳糖、果糖、ブドウ糖、デンプン、ゼラチン、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、またはその塩、エタノール、クエン酸、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

【0098】

それらの投与形態としては、また、必要な投与量範囲は、得られる化合物の選択、投与対象、投与経路、製剤の性質、患者の状態、そして医師の判断に左右される。しかし、適当な投与量は患者の体重1kgあたり例えば約1.0～1,500 μ g、好ましくは約10～500 μ g程度を投与するのが好ましい範囲である。投与経路の効率が異なることを考慮すれば、必要とされる投与量は広範囲に変動することが予測される。例えば経口投与は静脈注射による投与よりも高い投与量を必要とすると予想される。こうした投与量レベルの変動は、当業界でよく理解されているような、標準的経験的な最適化手順を用いて調整することができる。

【0099】

リラキシニン-3の活性を阻害する物質およびその使用

本発明に使用するリラキシニン-3（すなわち、リラキシニン-3、改変ポリペプチド、相同ポリペプチド）の活性を阻害する物質によれば、摂食亢進作用および体重増加作用を阻害することができる。そこで、リラキシニン-3の発現を阻害するものは、リラキシニン-3の*in vivo*、*ex vivo*および*in vitro*における摂食制御および体重制御に伴う機能（例えばエネルギー代謝調節、成長など）を制限するのに利用できる可能性がある。従って、例えば摂食抑制剤、抗肥満剤、糖尿病治療剤などとして使用することができる。

【0100】

本発明に使用するリラキシニン-3の活性を阻害する物質には、該活性を有する限り特に制限はないが、例えばリラキシニン-3をコードする塩基配列のアンチセンス配列を有するDNAや、リラキシニン-3をコードする塩基配列を有する2本鎖RNA（small interfering RNA；siRNA）、リボザイム等リラキシニン-3の発現を阻害するもの、あるいはリラキシニン-3の抗体や糖タンパク質、適当な化合物等のリラキシニン-3と相互作用してリラキシニン-3が有する活性を阻害する物質等が挙げられる。

【0101】

アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する機構としては、（1）3重鎖形成による転写開始阻害、（2）RNAポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位とのハイブリッド形成による転写抑制、（3）合成中のRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、（4）イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング抑制、（5）スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、（6）mRNAとのハイブリッド形成による、mRNAの細胞質への移行抑制、（7）キャッピング部位またはポリA付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、（8）翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、（9）リボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、（10）mRNA翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長抑制、並びに（11）核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる（平島および井上『新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp. 319-347（1993））。

【0102】

本発明に使用するリラキシニン-3のアンチセンス核酸は、上述の（1）～（11）のどの機構により遺伝子発現を抑制する核酸であってもよい。すなわち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンス核酸をコードするDNAは、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用され得る。アンチセンス核酸は、標的とする遺伝子の翻訳領域

または非翻訳領域に対して完全に相補的である必要はなく、効果的に該遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンス核酸は、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp以上、さらに好ましくは500bp以上であり、通常3000bp以内、好ましくは2000bp以内、より好ましくは1000bp以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上同一である。このようなアンチセンス核酸は、リラキシナー3の配列情報を基に、ホスホロチオネート法(Stein (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 3209-21)等により調製することができる。

【0103】

リボザイムとは、RNAを構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム(*large ribozyme*)およびスモールリボザイム(*small ribozyme*)に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に5'-リン酸と3'-ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さらに(1)グアノシンによる5'-スプライス部位でのトランスエステル化反応を行なうグループIイントロンRNA、(2)ラリアット構造を経る二段階反応により自己スプライシングを行なうグループIIイントロンRNA、および(3)加水分解反応によるtRNA前駆体を5'側で切断するリボヌクレアーゼPのRNA成分に分類される。それに対して、スモールリボザイムは、比較的小さな構造単位(40bp程度)であり、RNAを切断して、5'-ヒドロキシル基と2'-3'環状リン酸を生じさせる。スモールリボザイムには、ハンマーヘッド型(Koizumi et al. (1988) *FEBS Lett.* 228: 225)、ヘアピン型(Buzayan (1986) *Nature* 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) *Nucleic Acids Res.* 19: 6751; 菊地洋(1992) *化学と生物* 30: 112)等のリボザイムが含まれる。リボザイムは、改変および合成が容易なため多様な改良方法が公知であり、例えばリボザイムの基質結合部を標的的部位近くのRNA配列と相補的となるように設計することにより、標的RNA中の塩基配列UC、UUまたはUAを認識して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる(Koizumi et al. (1988) *FEBS Lett.* 228: 225; 小泉誠および大塚栄子(1990) *蛋白質核酸酵素* 35: 2191; Koizumi et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7059)。ヘアピン型のリボザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である(Kikuchi and Sasaki (1992) *Nucleic Acids Res.* 19: 6751; 菊地洋(1992) *化学と生物* 30: 112)。

【0104】

本発明に使用するアンチセンス核酸およびリボザイムは、細胞内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リボソーム等を利用した非ウイルスベクター、または*naked DNA*として*ex vivo*法または*in vivo*法により遺伝子治療に用いることもできる。または、本発明に使用するアンチセンス核酸およびリボザイムは、単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることができ、例えば摂食抑制剤、抗肥満剤、糖尿病治療剤として使用することができる。

【0105】

1998年に、線虫においてRNA同士が邪魔し合い働きを失う現象(RNA干渉)が観察された(Fire et al. (1998) *Nature* 391: 806-11)。RNA干渉とは、二本鎖の人工RNAを細胞に導入することにより、同じ塩基配列を有するRNAが分解される現象である。その後の研究により、RNA干渉等のRNAサイレンシングの現象は、欠陥を持つmRNAの排除、並びにトランスポゾン、ウイルス等の寄生体に対する防御のための細胞機構であることが示唆されている。現在では、多くの遺伝子の発現を抑制するためのツールとして、二本鎖RNA(*small inte*

referring RNA; siRNA) が利用されており、病気の原因遺伝子等の発現抑制を siRNA を用いて行なうことにより病気を治療・予防する方法も検討されている。本発明の siRNA は、リラキシニン-3 の mRNA の転写を阻害する限り、特に限定されない。通常、siRNA は、標的 mRNA の配列に対するセンス鎖およびアンチセンス鎖の組合せであり、少なくとも 10 個から標的 mRNA と同じ個数までのヌクレオチド長を有する。好ましくは、15~75 個、より好ましくは 18~50 個、さらに好ましくは 20~25 個のヌクレオチド長である。リラキシニン-3 の発現を抑制するために、siRNA は公知の方法により細胞に導入することができる。例えば siRNA を構成する二本の RNA 鎖を、一本鎖上にコードする DNA を設計し、該 DNA を発現ベクターに組み込み、細胞を該発現ベクターで形質転換し、siRNA をヘアピン構造を有する二本鎖 RNA として細胞内で発現させることができる。トランスフェクションにより持続的に siRNA を産生するプラスミド発現ベクターも設計されている (例えば RNAi-Ready pSIREN Vector、RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector (BD Biosciences Clontech 社))。siRNA の塩基配列は、例えば Ambion website (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) のコンピュータプログラムを用いて設計することができる。機能的 siRNA をスクリーニングするためのキット (例えば BD Knockout RNAi System (BD Biosciences Clontech 社)) 等も市販されており利用可能である。

【0106】

本発明に使用する抗体には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および抗体フラグメントが含まれる。

本発明に使用するモノクローナル抗体は、免疫用抗原およびスクリーニング用抗原として、リラキシニン-3 (すなわち、リラキシニン-3、改変ポリペプチド、相同ポリペプチド) またはそれらの部分断片を用いることを除いて、それ自体公知の手段により得ることができる。例えば前記免疫用抗原を用いてマウスを免疫し、そのマウスから取得した脾臓細胞と、マウス骨髄腫細胞とを、細胞融合法 (Nature, 256, 495 (1975))、または電気細胞融合法 (J. Immunol. Method, 100, 181-189 (1987)) を用いて細胞融合し、前記スクリーニング用抗原を用いてスクリーニングすることにより、本発明に使用するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

【0107】

前記ハイブリドーマを培養する培地としては、ハイブリドーマの培養に適した培地であればよく、好ましくはダルベッコ氏変法イーグル氏最小必須培地 (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium) にウシ胎児血清、L-グルタミン、L-ピルビン酸および抗生物質 (ペニシリン G およびストレプトマイシン) を含む培地が用いられる。前記ハイブリドーマの培養は、培地中に行なう場合には、5% CO₂ 濃度、37℃ の条件下で約 3 日間行なうことができる。また、マウスの腹腔内で培養する場合には、約 14 日間で行なうことができる。

【0108】

このようにして得られた培養液またはマウスの腹水から、タンパク質の分離および精製常法に従って、前記モノクローナル抗体を分離および精製することが可能である。このような方法としては、例えば硫酸塩析、イオン交換セルロースを用いるイオン交換カラムクロマトグラフィー、分子篩ゲルを用いる分子篩カラムクロマトグラフィー、プロテイン A 結合多糖類を用いる親和性カラムクロマトグラフィー、透析または凍結乾燥などを挙げることができる。

【0109】

また、本発明に使用するポリクローナル抗体も、免疫用抗原およびスクリーニング用抗原として、リラキシニン-3 (すなわち、リラキシニン-3、改変ポリペプチド、相同ポリペ

プチド) またはそれらの部分断片を用いることを除いて、それ自体公知の方法、例えば以下に示す方法により調製することができる。すなわち、抗原を含む生理食塩水を等量のフロイント氏完全アジュバンドもしくは不完全アジュバンド、またはその等価物、例えば Hunter's TiterMaxTM (フナコシ社) と乳化混合して、哺乳動物 (特にウサギまたはヤギなど) の皮下、腹腔内または筋肉内などのいずれかに投与する (初回免疫)。以後、2~4 週間の間隔で同様の操作を行い、数回免疫する。最終免疫から 1~2 週間後に哺乳動物の頸動脈または心臓から血液を採取して血清を硫酸アンモニウムによって塩析することにより調製することができる。

【0110】

本発明に使用する抗体フラグメントは、前記抗体 (モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む) の部分断片であって、しかも、元の抗体と同じ反応特異性を有する限り、特に限定されるものではない。本発明による抗体フラグメントとしては、例えば Fab、Fab'、F(ab')₂ または Fv を挙げることができる。本発明に使用する抗体フラグメントは、例えば前記によって得られることができるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を常法によりタンパク質分解酵素 (例えばトリプシンなど) によって消化し、続いて、タンパク質の分離および精製の常法に従って得ることができる。

【0111】

また別の態様によれば、本発明に使用する抗体は、国際公開第 01/068862 号パンフレット、特開 2002-345468 号明細書に記載の方法により得ることができる。また、公知となったリラキシン-3 の抗体を使用することができ、例えば特開 2002-345468 号明細書の実施例に記載された抗体 (モノクローナル抗体: HK4-144-10) を挙げることができる。

【0112】

本発明に使用する抗体は薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることもでき、例えば摂食 (もしくは食欲) 抑制剤、抗肥満剤、糖尿病治療剤として使用することができる。薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることができる。この時の有効成分の担体に対する割合は、1~90 重量%の間で変動され得る。また、かかる薬剤は、ヒトまたはヒト以外の生物 [例えば非ヒト哺乳動物 (例えばウシ、サル、トリ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど)、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など] に、種々の形態、経口または非経口 (例えば静脈注射、筋肉注射、皮下投与、直腸投与、経皮投与) のいずれかの投与経路で投与することができる。従って、本発明の抗体を含有する医薬組成物は、投与経路に応じて適当な剤形とされ、具体的には錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口剤、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口剤を挙げることができる。これらの製剤は通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤等を用いて常法により製造することができる。使用可能な無毒性の上記添加剤としては、例えば乳糖、果糖、ブドウ糖、デンプン、ゼラチン、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、またはその塩、エタノール、クエン酸、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

【0113】

それらの投与形態としては、また、必要な投与量範囲は、抗体の選択、投与対象、投与経路、製剤の性質、患者の状態、そして医師の判断に左右される。しかし、適当な投与量は患者の体重 1 kg あたり例えば約 0.01~30 mg、好ましくは約 0.1~10 mg 程度を投与するのが好ましい範囲である。投与経路の効率が異なることを考慮すれば、必要とされる投与量は広範に変動することが予測される。例えば経口投与は静脈注射による投与よりも高い投与量を必要とすると予想される。こうした投与量レベルの変動は、当業界でよく理解されているような、標準的経験的な最適化手順を用いて調整することができる。

【0114】

本明細書において「治療」とは、一般的に、所望の薬理学的効果および/または生理学的効果を得ることを意味する。効果は、疾病および/または症状を完全にまたは部分的に防止する点では予防的であり、疾病および/または疾病に起因する悪影響の部分的または完全な治癒という点では治療的である。本明細書において「治療」とは、哺乳動物、特にヒトの疾病の任意の治療を含み、例えば以下の (a) ~ (c) の治療を含む：

- (a) 疾病または症状の素因を持ちうるが、まだ持っているとは診断されていない患者において、疾病または症状が起こることを予防すること；
- (b) 疾病症状を阻害する、即ち、その進行を阻止、遅延すること；
- (c) 疾病症状を緩和すること、即ち、疾病または症状の後退、または症状の進行の逆転を引き起こすこと。

【実施例】

【0115】

以下、実施例により本発明についてより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何等限定されるものではない。

【0116】

【実施例1】 SALPRをコードするポリヌクレオチドの調製

SALPRをコードするポリヌクレオチドの単離は、配列番号3で表される核酸配列を基にして、以下のように行った。配列番号3では1857塩基対が示されており、SALPRをコードする領域は、361番目から1770番目（1410塩基対、470アミノ酸残基）とされている（GenBank アクセッション番号NM_016568）。PCR（polymerase chain reaction）により遺伝子を単離するために、配列番号5および配列番号6で表されるPCRプライマーを常法に従い作製した。

【0117】

human genomic DNA（Roche Diagnostics社）を鋳型として、配列番号5および配列番号6の組合せからなるPCRプライマーと、Expand High Fidelity PCR System（Roche Diagnostics社）を用い、（98℃ 1分—57℃ 1分—72℃ 3分）を添付の操作方法に従い、30回繰り返すことによりPCRを行った。その結果、約1,400塩基対のDNA断片を得た。

【0118】

このDNA断片を、pCR2.1（Invitrogen社）に挿入し、ABI prism DNA sequencing kit（Perkin-Elmer Applied Biosystems社）により配列を確認した。その結果、配列番号5および6からなるプライマーの組合せによって得られたpCR2.1-SALPRに挿入された1410塩基対の配列は、配列番号3における361番目から1770番目と長さは同一であったが、配列中には1つの変異が見られた。この変異は、該当部位の核酸配列から翻訳されるアミノ酸には影響を与えないことは明らかであり、SALPRをコードするポリヌクレオチドを得ることができた。

【0119】

【実施例2】 レトロウイルスベクタープラスミドの調製

pBabe Puro（Morgenstern, J. P. and Land, H. Nucleic Acids Res. vol. 18 3587-3596 (1990)）（配列番号7）からSalIおよびClaIで切断することによりSV40 promoter-puro（r）領域を除き、末端をKlenow fragmentにより平滑化した。ここへpIRES-hyg（Clontech社）からNsiIおよびXbaIで切断することによりIRES-hyg（r）領域を切り出し、T4ポリメラーゼにより末端を平滑化したものを挿入しpBabeXIHを得た。

【0120】

pBabeXIHからSspIおよびBamHIで切断することにより5'-LTR-

packaging signalを除いた。ここへpCLXSN (IMGENEX社) からSspIおよびBamHIで切断することにより切り出した5' LTR-CMV promoter-packaging signalを挿入しpBabeCLXIHを得た。

【0121】

[実施例3] SALPR遺伝子導入用レトロウイルスベクタープラスミドの調製

前記実施例2に記載のレトロウイルス発現用プラスミドpBabeCLXIHを制限酵素HpaIで切断した。ここへ前記実施例1で得たpCR2.1-SALPRからEcoRVで切断することによりSALPRをコードするポリヌクレオチドを切り出し、T4ポリメラーゼにより末端を平滑化したものを挿入しpBabeCL (SALPR) IHを得た(図1)。

【0122】

[実施例4] SALPR遺伝子導入用レトロウイルスベクターの調製

2×10^6 個の293-EBNA細胞 (Invitrogen社) を10cmコラーゲンコートディッシュ (IWAKI社) でDMEM (Sigma社) -10% fetal bovine serum (FCS) -ペニシリン (penicillin) 100 units/ml ストレプトマイシン (streptomycin) $100 \mu\text{g/ml}$ (PS) (以下、「EBNA培養液」と称する) 10mlを用いて培養した。翌日、pV-gp (pVPack-GP (Stratagene社) からNsiIおよびXbaIで切断することによりIRES-hisDを除きT4ポリメラーゼによる平滑化後、自己環化したもの)、pVPack-VSV-G (Stratagene社)、および実施例3で得たSALPR遺伝子導入用レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCL (SALPR) IH) それぞれ3.3 μg をリポフェクション試薬であるTransIT (Panvera社) を用いて、前記293-EBNA細胞にトランスフェクションした。その6~12時間後にEBNA培養液を交換し、37℃で培養を続けた。

【0123】

トランスフェクション2日後に培養液を回収し、1,200×gで10分間遠心した。その上清を0.45 μm のフィルター (Millipore社) でろ過したものを非濃縮レトロウイルスベクターとして、さらにウイルスベクターの濃縮を以下に行った。

超遠心用チューブ50 Ultra-Clear Tubes (Beckman社) を70%エタノールで消毒後に蒸留水ですすぎ、ここへ非濃縮ウイルスベクター約35mlを入れた。これを超遠心ローターSW28 (Beckman社) に入れ、超遠心装置XL-90 (Beckman社) を使って19,500 rpm 100分間の遠心操作を行った。遠心後、上清を捨てたチューブを氷に入れて放置した。1時間後、チューブ壁面に残った培養液約100 μl 程度の濃縮ウイルスベクター溶液が得られた。

【0124】

[実施例5] サイクリックAMP応答配列を含むレポーター系導入細胞SE302の構築

(1) サイクリックAMP応答配列を含むレポーターDNAの作成

公表された論文 (Durocher et al. Anal Biochem 2000 284 (2): 316-26) を参考にcAMPに応じた転写がみられるunitを以下のように構築した。

cAMP responsive element (CRE) を含むunitの作成のために、CREx2hb用として配列番号8および配列番号9、CREx2bp用として配列番号10および配列番号11で表されるオリゴDNAを常法に従い作成した。それぞれの組合せからなるオリゴDNAを95℃に熱処理後、徐々に温度を室温まで下げるにより二本鎖DNA (CREx2hb、CREx2bp) を形成させた。CREx2hbをHindIII、BamHI、CREx2bpをBamHI、PstIで消化するとともに、pBluescriptISK (+) (Stratagene社) をHindIII、PstIで消化した。消化したDNAを電気泳動して両端に制限酵素消化部位をもつDNAを精製した後、これら3つのDNA (CREx2hb、CREx2bp、

pBluescript IISK (+) を一度に連結し (ligation)、得られたプラスミドの配列を解析して、CRE4/pBluescript IISK を作成した。

【0125】

次にVIP (vasoactive intestinal peptide) プロモーターを含むDNAを得るために配列番号12および配列番号13で表されるPCRプライマーを常法に従い作成した。

Human genomic DNA (Roche Diagnostics社) を鋳型とし、配列番号12および配列番号13の組合せからなるPCRプライマーと、recombinant Taq polymerase (Takara社) を用いて (94℃ 30秒-55℃ 30秒-72℃ 1分) を35回繰り返すことによりPCRしたところ、264塩基対のDNA (配列番号14) が得られた。この264塩基対のDNAをPst Iで消化するとともにCRE4/pBluescript IISK (+) のPst Iサイトに挿入し、得られたプラスミドの配列を確認してCRE4VIP/pBluescript IISK (+) を作成した。得られたCRE4VIP/pBluescript IISK (+) からHind IIIとSma Iで消化した後、得られたCRE4VIPプロモーター断片の末端平滑化を行なった。

【0126】

前述の発現用ウイルスベクタープラスミドpBabeCLX IHよりIRES~hygro (r) 領域を除去したpBabeCLXを作成した。pBabeCLXよりレトロウイルス本来のエンハンサー活性 (LTR) 中のNhe I~Nar I領域を除去することによって得られた外来性プロモーター導入用レトロウイルスベクタープラスミドに、CREとVIPプロモーターを含む配列と、レポーター遺伝子である胎盤由来アルカリフォスファターゼ (PLAP) (Gotoら, Molecular Pharmacology, 49, p. 860-873, 1996) を導入し、pBabeCLcre4vpdNNを得た (図2)。

【0127】

(2) サイクリックAMP応答配列を含むレポーター系導入細胞SE302の樹立

サイクリックAMP応答配列によりレポーター遺伝子PLAPが誘導されるレトロウイルスベクタープラスミドpBabeCLcre4vpdNNを用い、実施例4に記載の方法に準じてレトロウイルスベクターを調製した。調製したレトロウイルスベクターをHEK293細胞に導入し、限界希釈法により細胞をクローン化して、PLAP誘導の反応性が最も良かったクローン (以下、「SE302細胞」と称する) を以下の実験に供した。

【0128】

[実施例6] SALPR遺伝子導入用レトロウイルスベクターによるSALPR発現細胞の調製

前記の実施例4で調製したレトロウイルスベクターによる細胞へのSALPR遺伝子導入を以下のように行った。

前記実施例5で構築した 3×10^3 個のSE302細胞を96well plate (旭テクノガラス社) にDMEM (SIGMA社) -10% fetal bovine serum (FCS) -PS (以下、「培養液」と称する) $100 \mu\text{l}$ を用いて培養した。翌日、実施例4で調製したレトロウイルスベクターを適宜希釈し、その $100 \mu\text{l}$ を培養液で調製したpolybrene (最終濃度 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$) (別名 hexadimethrine bromide Sigma社) とともにSE302細胞に加えた。その翌日、培養液を $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ のハイグロマイシン (Hygromycin) (Invitrogen社) 含有の培養液 $200 \mu\text{l}$ と交換し培養した。この条件で増殖してきたSALPR遺伝子導入SE302細胞 (以下、「SALPR-SE302細胞」と称する) を適時継代して実験に供した。

【0129】

[実施例7] SALPR-SE302細胞におけるフォルスコリン添加によって増加させ

た転写活性のリラキシナー3による抑制

前記実施例6で構築したSALPR-SE302細胞を、転写活性測定用培地(DMEM-10%FBS(65℃にて30分非動化)を加えたもの)にて懸濁した後、96well plate(Beckton Dickinson社)に1穴あたり 1×10^4 となるようにまいた。翌日、アッセイ用培地(DMEMに0.1%ウシ血清アルブミンを加えたもの)で希釈した各濃度のリラキシナー3(Relaxin-3)/INSL7(Phoenix Pharmaceuticals社)またはインスリン(Invitrogen社)を添加し、その後フォルスコリン(Carbio Chem社)を最終濃度 $1 \mu\text{mol/L}$ となるように添加した。さらに一日培養後、細胞上清を $15 \mu\text{l}$ 回収して化学発光測定用の96well plate(住友ベークライト社)に移し、アッセイ用緩衝液(280mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 、 8mmol/L MgSO_4 、 $\text{pH}10$)を $60 \mu\text{l}$ 、Lumiphos 530(Lumigen社) $70 \mu\text{l}$ を添加して、室温にて1時間反応させた後、各wellの化学発光をFusionプレートリーダー(Perkin Elmer社)にて測定し転写活性量とした。フォルスコリン $1 \mu\text{mol/L}$ を添加した細胞上清の転写活性を100%とし、フォルスコリンを添加していない細胞の上清の活性を0%として各被検サンプルを加えた細胞上清中の活性を%で表示した(図3)。

【0130】

その結果、フォルスコリンによる転写活性の上昇をリラキシナー3はSALPRの活性化を介して抑制することが分かった。この転写活性の上昇は関連ペプチドであるインスリンでは影響がなかったので、リラキシナー3特異的な反応であることが分かった。すなわちこの実験系を用いることで、リラキシナー3によるSALPRの活性化に影響を与える化合物、物質を判別できることが示された。

【0131】

【実施例8】リラキシナー3脳室内投与による摂食量亢進作用

(1) 実験動物と脳室内投与のための前処置

Wistar雄性ラット(日本チャールズリバー社)は実験動物用飼料MF(オリエンタル酵母社)を与えて馴化した。ラット(250~300g)を麻酔下で、側脳室にカニユーレを挿入した。その後一週間以上飼育した後に投与実験を行った。

(2) リラキシナー3溶液の調製

$60 \mu\text{g}$ のリラキシナー3(Phoenix Pharmaceutical社)をDMSO(dimethylsulfoxide)にて溶解した後、最終濃度が $200 \mu\text{mol/L}$ となるように人工的脳脊髄液(artificial cerebrospinal fluid)を添加して調製した。析出した沈殿は遠心操作をして取り除き、上清をリラキシナー3投与液として用いた。ラットへの投与量(投与液中のリラキシナー3濃度)は実施例7に示された実験系にて、リラキシナー3による標準曲線を用いて算出したところ、約 50pmol /ラットであった。

(3) リラキシナー3溶液の脳室内投与

ガイドカニユーレを装着したラットを2群に分け(1群6匹)、リラキシナー3投与液もしくはvehicle(リラキシナー3を除いた前記(2)と同じ組成の溶液)を $5 \mu\text{l}$ /2分の速度でインフュージョンポンプを用いてラットに投与した。

(4) 摂餌量の測定

投与液の脳室内投与後すぐに、ラットは予め重量を測定した餌を入れてあるケージに入れ自由摂食させた。2時間後に餌の減少量を測定することで摂餌量を算出した。各群の平均摂餌量と標準偏差を図4に示す。その結果、投与後2時間の摂餌量は、リラキシナー3を約 50pmol 投与したラットではvehicle投与のラットに比べて有意に増加していた(t-検定、 $p < 0.01$)。従って、リラキシナー3は摂食行動を制御することが分かった。

【0132】

【実施例9】リラキシナー3の単回脳室内投与時の血中レプチン濃度上昇

血中レプチン濃度の測定

摂餌量測定後（投与後約3時間後）に前記ラットをネンブータルにて麻酔し、その腹部大動脈より血液を採取した。採取した血液を1, 750×gで15分間遠心し、その上清を-80℃にて保存した。後日、上清中のレプチン量をラットレプチン定量ELISAキット（アマシャムバイオサイエンス社）により定量した。

その結果、単回のリラキシナー3投与ラットでvehicle投与のラットより血中のレプチン濃度が有意に上昇することが明らかとなった（t-検定、 $p < 0.05$ 、図5）。

【0133】

【実施例10】 リラキシナー3持続投与による体重増加、摂餌量への作用

(1) リラキシナー3溶液の調製

リラキシナー3（ペプチド研究所）を生理的食塩水にて100 $\mu\text{mol/L}$ となるように溶解し、vehicle（生理食塩水）またはリラキシナー3溶液を浸透圧ポンプ（alzet osmotic pump model 1002 投与量 6 $\mu\text{L/日}$ ）とチューブ・投与用カニューレに注入しそれらを接続した。

(2) 実験動物と脳室内投与のための処置

Wistar雄性ラット（日本チャールズリバー社）に実験動物用飼料MF（オリエンタル酵母社）を与え、個別飼育で4日間馴化した。前記ラット（250～270g）を麻酔下で、側脳室にガイドカニューレを挿入し、浸透圧ポンプを皮下に収めた。手術日をday 0として自由摂食下で飼育し、毎朝、体重と餌量を測定した。0日目からの体重の増加量を図6に示した。また、摂餌量は、手術前日から0日までをday 0とし、一日当たりの餌の減少量を摂餌量として示した（図7）。

手術後1日目よりリラキシナー3投与ラット群では有意な体重の増加が確認された。また、リラキシナー3投与群の摂餌量も1日目より有意に増加した。

【0134】

【実施例11】 リラキシナー3持続投与による体重増加、運動量への作用

(1) リラキシナー3溶液の調製

リラキシナー3（ペプチド研究所）を生理的食塩水にて100 $\mu\text{mol/L}$ となるように溶解し、vehicle（生理食塩水）またはリラキシナー3溶液を浸透圧ポンプ（alzet osmotic pump model 1002 投与量 6 $\mu\text{L/日}$ ）とチューブ・投与用カニューレに注入しそれらを接続した。

(2) 実験動物と脳室内投与のための処置

Wistar雄性ラット（日本チャールズリバー社）に実験動物用飼料MF（オリエンタル酵母社）を与え、個別飼育で5日間馴化した。前記ラット（170～200g）を麻酔下で、側脳室にガイドカニューレを挿入し、浸透圧ポンプを皮下に収めた。手術日を0日として運動量の測定日以外は自由摂食・飲水下で飼育し、毎朝体重を測定した（図8）。

前記実施例9と同様に、投与後1日後からリラキシナー3投与ラット群では有意な体重の増加が確認された（t-検定、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ ）。

(3) 自発運動量の測定

前記(2)にて、リラキシナー3投与ラットの体重増加作用に有意な差が認められた日における明期および暗期の自発運動量をVersamax（Accuscan社）を用いての測定した。明期（投与開始後2、7日後）、暗期（投与開始後3、8日後）のラットを実験開始の1時間以上前に個別飼育台から実験室へ移動して馴化した後、Versamaxケージ内にラットを入れ直後から90分間の行動量を記録し、その結果を図9に示した。図9は90分間の全活動量を示した。

いずれの日においても各群のラットで運動量には有意な変化は認められなかった。すなわち、リラキシナー3による体重増加作用は自発運動量の変化が作用しているのではないことが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【0135】

【図1】 pBabeCL (SALPR) IHの構築図を示す。

【図2】 pBabeCL cre4 vPdNNの構築図を示す。

【図3】 SALPR/GPR135を発現させたSE302細胞におけるフォルスコリン添加によって増加させた転写活性のリラキシナー3による特異的な用量依存的抑制を示す。■はリラキシナー3を添加した場合を示す。□はインスリンを添加した場合を示す。横軸の数字は添加した各リガンドの最終濃度 (nmol/L) を示す。縦軸はフォルスコリン $1 \mu\text{mol/L}$ を添加した細胞上清のアルカリフォスファターゼの活性を100、フォルスコリンを添加していない細胞上清の活性を0として算出した各活性の割合を示す。各点は平均値 (N=3) と標準偏差を示す。

【図4】 正常ラットの脳室内に投与したリラキシナー3の摂餌量に対する作用を示す。□はvehicle投与群を、■はリラキシナー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹あたりの摂餌量 (g) の平均値を示す。

【図5】 正常ラットの脳室内に投与したリラキシナー3の血中レプチン濃度に対する作用を示す。□はvehicle投与群を、■はリラキシナー3投与群を示す。縦軸は各群の血中のレプチン濃度 (ng/mL) の平均値を示す。

【図6】 正常ラットの脳室内に持続投与したリラキシナー3の体重増加量に対する作用を示す。□はvehicle投与群を、■はリラキシナー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹あたりの体重増加量 (g) の平均値を示す。

【図7】 正常ラットの脳室内に持続投与したリラキシナー3の摂餌量に対する作用を示す。□はvehicle投与群を、■はリラキシナー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹あたりの摂餌量 (g) の平均値を示す。

【図8】 脳室内にリラキシナー3を持続投与した後、自発運動量を測定しながら飼育したラットの体重増加量に対する作用を示す。□はvehicle投与群を、■はリラキシナー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹あたりの体重増加量 (g) の平均値を示す。図中の△は明期の運動量測定日、▲は暗期の運動量測定日を示す。

【図9】 脳室内にリラキシナー3を持続投与したラットの自発運動量に対する作用を示す。□はvehicle投与群を、■はリラキシナー3投与群を示す。縦軸は各群の一匹あたりの全活動量 (count) の平均値を示す。

SEQUENCE LISTING

出証特 2 0 0 5 - 3 0 3 1 5 2 4

ccc cag gcc ttt tac agg ggg cga ccc agc tgg caa gga acc cct ggg 336
Pro Gln Ala Phe Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln Gly Thr Pro Gly
100 105 110

gtt ctt cgg ggc agc cga gat gtc ctg gct ggc ctt tcc agc agc tgc 384
Val Leu Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys
115 120 125

tgc aag tgg ggg tgt agc aaa agt gaa atc agt agc ctt tgc tag 429
Cys Lys Trp Gly Cys Ser Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys
130 135 140

<210> 2
<211> 142
<212> PRT
<213> Human

<400> 2

Met Ala Arg Tyr Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Trp Val Leu Thr
1 5 10 15

Gly Glu Leu Trp Pro Gly Ala Glu Ala Arg Ala Ala Pro Tyr Gly Val
20 25 30

Arg Leu Cys Gly Arg Glu Phe Ile Arg Ala Val Ile Phe Thr Cys Gly
35 40 45

Gly Ser Arg Trp Arg Arg Ser Asp Ile Leu Ala His Glu Ala Met Gly
50 55 60

Asp Thr Phe Pro Asp Ala Asp Ala Asp Glu Asp Ser Leu Ala Gly Glu
65 70 75 80

Leu Asp Glu Ala Met Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Leu Thr Lys Ser
85 90 95

Pro Gln Ala Phe Tyr Arg Gly Arg Pro Ser Trp Gln Gly Thr Pro Gly
100 105 110

Val Leu Arg Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Gly Leu Ser Ser Ser Cys

115

120

125

Cys Lys Trp Gly Cys Ser Lys Ser Glu Ile Ser Ser Leu Cys
 130 135 140

<210> 3
 <211> 1857
 <212> DNA
 <213> Human

<220>
 <221> CDS
 <222> (361)..(1770)
 <223>

<400> 3
 gatttgggga gttatgcgcc agtgccccag tgaccgcggg acacggagag gggaagtctg 60
 cgttgtacat aaggacctag ggactccgag cttggcctga gaacccttgg acgccgagtg 120
 cttgccttac gggctgcact cctcaactct gtcctaaagc agccgctgag ctcaactcct 180
 gcgtccaggg cgctcgctgc gcgccaggac gcgcttagta cccagttcct gggctctctc 240
 ttcagtagct gctttgaaag ctcccacgca cgtcccgag gctagcctgg caacaaaact 300
 ggggtaaacc gtgttatctt aggtcttgtc cccagaaca tgacctagag gtacctgcgc 360
 atg cag atg gcc gat gca gcc acg ata gcc acc atg aat aag gca gca 408
 Met Gln Met Ala Asp Ala Ala Thr Ile Ala Thr Met Asn Lys Ala Ala
 1 5 10 15
 ggc ggg gac aag cta gca gaa ctc ttc agt ctg gtc ccg gac ctt ctg 456
 Gly Gly Asp Lys Leu Ala Glu Leu Phe Ser Leu Val Pro Asp Leu Leu
 20 25 30
 gag gcg gcc aac acg agt ggt aac gcg tcg ctg cag ctt ccg gac ttg 504
 Glu Ala Ala Asn Thr Ser Gly Asn Ala Ser Leu Gln Leu Pro Asp Leu
 35 40 45
 tgg tgg gag ctg ggg ctg gag ttg ccg gac ggc gcg ccg cca gga cat 552
 Trp Trp Glu Leu Gly Leu Glu Leu Pro Asp Gly Ala Pro Pro Gly His
 50 55 60
 ccc ccg ggc agc ggc ggg gca gag agc gcg gac aca gag gcc cgg gtg 600
 Pro Pro Gly Ser Gly Gly Ala Glu Ser Ala Asp Thr Glu Ala Arg Val
 65 70 75 80

| | |
|---|------|
| cgg att ctc atc agc gtg gtg tac tgg gtg gtg tgc gcc ctg ggg ttg Arg Ile Leu Ile Ser Val Val Tyr Trp Val Val Cys Ala Leu Gly Leu 85 90 95 | 648 |
| gcg ggc aac ctg ctg gtt ctc tac ctg atg aag agc atg cag ggc tgg Ala Gly Asn Leu Leu Val Leu Tyr Leu Met Lys Ser Met Gln Gly Trp 100 105 110 | 696 |
| cgc aag tcc tct atc aac ctc ttc gtc acc aac ctg gcg ctg acg gac Arg Lys Ser Ser Ile Asn Leu Phe Val Thr Asn Leu Ala Leu Thr Asp 115 120 125 | 744 |
| ttt cag ttt gtg ctc acc ctg ccc ttc tgg gcg gtg gag aac gct ctt Phe Gln Phe Val Leu Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Glu Asn Ala Leu 130 135 140 | 792 |
| gac ttc aaa tgg ccc ttc ggc aag gcc atg tgt aag atc gtg tcc atg Asp Phe Lys Trp Pro Phe Gly Lys Ala Met Cys Lys Ile Val Ser Met 145 150 155 160 | 840 |
| gtg acg tcc atg aac atg tac gcc agc gtg ttc ttc ctc act gcc atg Val Thr Ser Met Asn Met Tyr Ala Ser Val Phe Phe Leu Thr Ala Met 165 170 175 | 888 |
| agt gtg acg cgc tac cat tcg gtg gcc tcg gct ctg aag agc cac cgg Ser Val Thr Arg Tyr His Ser Val Ala Ser Ala Leu Lys Ser His Arg 180 185 190 | 936 |
| acc cga gga cac ggc cgg ggc gac tgc tgc ggc cgg agc ctg ggg gac Thr Arg Gly His Gly Arg Gly Asp Cys Cys Gly Arg Ser Leu Gly Asp 195 200 205 | 984 |
| agc tgc tgc ttc tcg gcc aag gcg ctg tgt gtg tgg atc tgg gct ttg Ser Cys Cys Phe Ser Ala Lys Ala Leu Cys Val Trp Ile Trp Ala Leu 210 215 220 | 1032 |
| gcc gcg ctg gcc tcg ctg ccc agt gcc att ttc tcc acc acg gtc aag Ala Ala Leu Ala Ser Leu Pro Ser Ala Ile Phe Ser Thr Thr Val Lys 225 230 235 240 | 1080 |
| gtg atg ggc gag gag ctg tgc ctg gtg cgt ttc ccg gac aag ttg ctg Val Met Gly Glu Glu Leu Cys Leu Val Arg Phe Pro Asp Lys Leu Leu 245 250 255 | 1128 |
| ggc cgc gac agg cag ttc tgg ctg ggc ctc tac cac tcg cag aag gtg Gly Arg Asp Arg Gln Phe Trp Leu Gly Leu Tyr His Ser Gln Lys Val 260 265 270 | 1176 |
| ctg ttg ggc ttc gtg ctg ccg ctg ggc atc att atc ttg tgc tac ctg Leu Leu Gly Phe Val Leu Pro Leu Gly Ile Ile Ile Leu Cys Tyr Leu | 1224 |

| 275 | 280 | 285 | |
|---|-----|-----|------|
| ctg ctg gtg cgc ttc atc gcc gac cgc cgc gcg gcg ggg acc aaa gga Leu Leu Val Arg Phe Ile Ala Asp Arg Arg Ala Ala Gly Thr Lys Gly 290 295 300 | | | 1272 |
| ggg gcc gcg gta gcc gga gga cgc ccg acc gga gcc agc gcc cgg aga Gly Ala Ala Val Ala Gly Gly Arg Pro Thr Gly Ala Ser Ala Arg Arg 305 310 315 320 | | | 1320 |
| ctg tcg aag gtc acc aaa tca gtg acc atc gtt gtc ctg tcc ttc ttc Leu Ser Lys Val Thr Lys Ser Val Thr Ile Val Val Leu Ser Phe Phe 325 330 335 | | | 1368 |
| ctg tgt tgg ctg ccc aac cag gcg ctc acc acc tgg agc atc ctc atc Leu Cys Trp Leu Pro Asn Gln Ala Leu Thr Thr Trp Ser Ile Leu Ile 340 345 350 | | | 1416 |
| aag ttc aac gcg gtg ccc ttc agc cag gag tat ttc ctg tgc cag gta Lys Phe Asn Ala Val Pro Phe Ser Gln Glu Tyr Phe Leu Cys Gln Val 355 360 365 | | | 1464 |
| tac gcg ttc cct gtg agc gtg tgc cta gcg cac tcc aac agc tgc ctc Tyr Ala Phe Pro Val Ser Val Cys Leu Ala His Ser Asn Ser Cys Leu 370 375 380 | | | 1512 |
| aac ccc gtc ctc tac tgc ctc gtg cgc cgc gag ttc cgc aag gcg ctc Asn Pro Val Leu Tyr Cys Leu Val Arg Arg Glu Phe Arg Lys Ala Leu 385 390 395 400 | | | 1560 |
| aag agc ctg ctg tgg cgc atc gcg tct cct tcg atc acc agc atg cgc Lys Ser Leu Leu Trp Arg Ile Ala Ser Pro Ser Ile Thr Ser Met Arg 405 410 415 | | | 1608 |
| ccc ttc acc gcc act acc aag ccg gag cac gag gat cag ggg ctg cag Pro Phe Thr Ala Thr Thr Lys Pro Glu His Glu Asp Gln Gly Leu Gln 420 425 430 | | | 1656 |
| gcc ccg gcg ccg ccc cac gcg gcc gcg gag ccg gac ctg ctc tac tac Ala Pro Ala Pro Pro His Ala Ala Ala Glu Pro Asp Leu Leu Tyr Tyr 435 440 445 | | | 1704 |
| cca cct ggc gtc gtg gtc tac agc ggg ggg cgc tac gac ctg ctg ccc Pro Pro Gly Val Val Val Tyr Ser Gly Gly Arg Tyr Asp Leu Leu Pro 450 455 460 | | | 1752 |
| agc agc tct gcc tac tga cgcaggcctc aggcccaggg cgcgccgtcg Ser Ser Ser Ala Tyr 465 | | | 1800 |

gggcaaggtg gccttccccg ggcggtaaag aggtgaaagg atgaaggagg gctggggg

1857

<210> 4
<211> 469
<212> PRT
<213> Human

<400> 4

Met Gln Met Ala Asp Ala Ala Thr Ile Ala Thr Met Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Gly Gly Asp Lys Leu Ala Glu Leu Phe Ser Leu Val Pro Asp Leu Leu
20 25 30

Glu Ala Ala Asn Thr Ser Gly Asn Ala Ser Leu Gln Leu Pro Asp Leu
35 40 45

Trp Trp Glu Leu Gly Leu Glu Leu Pro Asp Gly Ala Pro Pro Gly His
50 55 60

Pro Pro Gly Ser Gly Gly Ala Glu Ser Ala Asp Thr Glu Ala Arg Val
65 70 75 80

Arg Ile Leu Ile Ser Val Val Tyr Trp Val Val Cys Ala Leu Gly Leu
85 90 95

Ala Gly Asn Leu Leu Val Leu Tyr Leu Met Lys Ser Met Gln Gly Trp
100 105 110

Arg Lys Ser Ser Ile Asn Leu Phe Val Thr Asn Leu Ala Leu Thr Asp
115 120 125

Phe Gln Phe Val Leu Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Glu Asn Ala Leu
130 135 140

Asp Phe Lys Trp Pro Phe Gly Lys Ala Met Cys Lys Ile Val Ser Met
145 150 155 160

Val Thr Ser Met Asn Met Tyr Ala Ser Val Phe Phe Leu Thr Ala Met
165 170 175

Ser Val Thr Arg Tyr His Ser Val Ala Ser Ala Leu Lys Ser His Arg
180 185 190

Thr Arg Gly His Gly Arg Gly Asp Cys Cys Gly Arg Ser Leu Gly Asp
195 200 205

Ser Cys Cys Phe Ser Ala Lys Ala Leu Cys Val Trp Ile Trp Ala Leu
210 215 220

Ala Ala Leu Ala Ser Leu Pro Ser Ala Ile Phe Ser Thr Thr Val Lys
225 230 235 240

Val Met Gly Glu Glu Leu Cys Leu Val Arg Phe Pro Asp Lys Leu Leu
245 250 255

Gly Arg Asp Arg Gln Phe Trp Leu Gly Leu Tyr His Ser Gln Lys Val
260 265 270

Leu Leu Gly Phe Val Leu Pro Leu Gly Ile Ile Ile Leu Cys Tyr Leu
275 280 285

Leu Leu Val Arg Phe Ile Ala Asp Arg Arg Ala Ala Gly Thr Lys Gly
290 295 300

Gly Ala Ala Val Ala Gly Gly Arg Pro Thr Gly Ala Ser Ala Arg Arg
305 310 315 320

Leu Ser Lys Val Thr Lys Ser Val Thr Ile Val Val Leu Ser Phe Phe
325 330 335

Leu Cys Trp Leu Pro Asn Gln Ala Leu Thr Thr Trp Ser Ile Leu Ile
340 345 350

Lys Phe Asn Ala Val Pro Phe Ser Gln Glu Tyr Phe Leu Cys Gln Val
355 360 365

Tyr Ala Phe Pro Val Ser Val Cys Leu Ala His Ser Asn Ser Cys Leu
 370 375 380

Asn Pro Val Leu Tyr Cys Leu Val Arg Arg Glu Phe Arg Lys Ala Leu
 385 390 395 400

Lys Ser Leu Leu Trp Arg Ile Ala Ser Pro Ser Ile Thr Ser Met Arg
 405 410 415

Pro Phe Thr Ala Thr Thr Lys Pro Glu His Glu Asp Gln Gly Leu Gln
 420 425 430

Ala Pro Ala Pro Pro His Ala Ala Ala Glu Pro Asp Leu Leu Tyr Tyr
 435 440 445

Pro Pro Gly Val Val Val Tyr Ser Gly Gly Arg Tyr Asp Leu Leu Pro
 450 455 460

Ser Ser Ser Ala Tyr
 465

<210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A sense primer

<400> 5
 gatatcgccg ccaccatgca gatggccgat gcagccac

38

<210> 6
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> An antisense primer

<400> 6

gatatctcag taggcagagc tgctgggc

28

<210> 7

<211> 5020

<212> DNA

<213> Plasmid

<400> 7

| | |
|--|------|
| ctgcagcctg aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccggctca | 60 |
| gggccaagaa cagatggaac agctgaatat gggccaaaca ggatatctgt ggtaagcagt | 120 |
| tcctgccccg gctcagggcc aagaacagat ggtccccaga tgcggtccag ccctcagcag | 180 |
| tttctagaga accatcagat gtttccaggg tgccccaagg acctgaaatg accctgtgcc | 240 |
| ttatttgaac taaccaatca gttcgttctt cgcttctgtt cgcgcgcttc tgctccccga | 300 |
| gctcaataaa agagcccaca acccctcact cggggcgcca gtcctccgat tgactgagtc | 360 |
| gcccgggtac ccgtgtatcc aataaacctt cttgcagttg catccgactt gtggtctcgc | 420 |
| tgttccittgg gagggctctc tctgagtgat tgactaccgc tcagcggggg tctttcatTT | 480 |
| gggggctcgt ccgggatcgg gagacccttg cccagggacc accgaccac caccgggagg | 540 |
| taagctggcc agcaacttat ctgtgtctgt ccgattgtct agtgtctatg actgatttta | 600 |
| tgcgcctgcg tcggtactag ttagctaact agctctgtat ctggcggacc cgtggtggaa | 660 |
| ctgacgagtt ctgaacaccc ggccgcaacc ctgggagacg tcccagggac tttggggggc | 720 |
| gtttttgtgg cccgacctga ggaaggaggt cgatgtggaa tccgaccccg tcaggatatg | 780 |
| tggttctggt aggagacgag aacctaaaac agttcccgcc tccgtctgaa tttttgcttt | 840 |
| cggtttgga ccgaagccgc gcgtcttgtc tgctgcagca tcgttctgtg ttgtctctgt | 900 |
| ctgactgtgt ttctgtatTT gtctgaaaat tagggccaga ctgttaccac tcccttaagt | 960 |
| ttgaccttag atcactggaa agatgtcgag cggctcgttc acaaccagtc ggtagatgtc | 1020 |
| aagaagagac gttgggttac cttctgctct gcagaatggc caacctttaa cgtcggatgg | 1080 |
| ccgcgagacg gcacctttaa ccgagacctc atcaccaggt ttaagatcaa ggtcttttca | 1140 |
| cctggccccg atggacaccc agaccaggtc ccctacatcg tgacctggga agccttggct | 1200 |

tttgaccccc ctccctgggt caagcccttt gtacacccta agcctccgcc tcctcttctt 1260
ccatccgcgc cgtctctccc ccttgaacct cctctttcga ccccgccctca atcctccctt 1320
tatccagccc tcactccttc tctaggcgcc ggccggatcc cagtgtggtg gtacgtagga 1380
attcgccagc acagtggctg acctgtggaa tgtgtgtcag ttaggggtgtg gaaagtcccc 1440
aggctcccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccaggtg 1500
tggaagtc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc 1560
agcaaccata gtcccgcccc taactccgcc catcccgccc ctaactccgc ccagttccgc 1620
ccattctccg ccccatggct gactaat ttttatttat gcagaggccg aggccgcctc 1680
ggcctctgag ctattccaga agtagtgagg aggctttttt ggaggcctag gcttttgcaa 1740
acgctgcttg aggctgaagg tgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac 1800
gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga 1860
taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt 1920
accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc 1980
tgtaggtatc tcagttcgtt gtaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc 2040
cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta 2100
agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat 2160
gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca 2220
gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct 2280
tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt 2340
acgatcgata aaataaaaga ttttatttag tctccagaaa aaggggggaa tgaaagaccc 2400
cacctgtagg tttggcaagc tagcttaagt aacgccattt tgcaaggcat ggaaaaatac 2460
ataactgaga atagagaagt tcagatcaag gtcaggaaca gatggaacag ctgaatatgg 2520
gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc tcagggccaa gaacagatgg 2580
aacagctgaa tatgggcaa acaggatatc tgtggtgaagc agttcctgcc ccggctcagg 2640
gccaagaaca gatggtcccc agatgcggtc cagccctcag cagtttctag agaaccatca 2700

gatgtttcca gggtgcccca aggacctgaa atgaccctgt gccttatttg aactaaccaa 2760
tcagttcgct tctcgcttct gttcgcgcg cttctgctccc cgagctcaat aaaagagccc 2820
acaaccctc actcggggcg ccagtcctcc gattgactga gtcgcccggg taccctgtga 2880
tccaataaac cctcttgag ttgcatccga cttgtggtct cgctgttctt tgggagggtc 2940
tcctctgagt gattgactac ccgtcagcgg gggctcttca catgcagcat gtatcaaaat 3000
taatttggtt ttttttctta agtatttaca ttaaattggcc atagttgcat taatgaatcg 3060
gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg 3120
actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa 3180
tacggttatt cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc 3240
aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggtt tttccatagg ctccgcccc 3300
ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat 3360
aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc 3420
cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct 3480
cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg 3540
aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc 3600
cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga 3660
ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa 3720
ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta 3780
gctcttgatc cggcaaacaa accaccgtg gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc 3840
agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg 3900
acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga 3960
tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagtttgcg gccgcaaata aatctaaagt 4020
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca 4080
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg 4140
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca 4200

ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgg 4260
cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt 4320
agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgtca 4380
cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca 4440
tgatccccc tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga 4500
agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 4560
gtcatgcat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga 4620
gaatagtgt tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caacacggga taataccgcg 4680
ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc 4740
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga 4800
tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat 4860
gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt 4920
caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 4980
atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc 5020

<210> 8
<211> 83
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A sense strand for CREx2hb

<400> 8
cccaagcttg atatcgaatt cgacgtcaca gtatgacggc catgggaatt cgacgtcaca 60
gtatgacggc catggggatc ccg 83

<210> 9
<211> 83
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> An antisense strand for CREx2hb

<400> 9
cgggatcccc atggccgtca tactgtgacg tcgaattccc atggccgtca tactgtgacg 60
tcgaattcga tatcaagctt ggg 83

<210> 10
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A sense strand for CREx2bp

<400> 10
tgcactgcag gaattcccat ggccgtcata ctgtgacgtc gaattcccat ggccgtcata 60
ctgtgacgtc ggatcccg 78

<210> 11
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> An antisense strand for CREx2bp

<400> 11
cgggatccga cgtcacagta tgacggccat gggaattcga cgtcacagta tgacggccat 60
gggaattcct gcagtgca 78

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A sense primer

<400> 12
tcgactgcag cccatggccg tcataactgtg 30

<210> 13
<211> 30
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> An antisense primer

<400> 13

tgactgcag gtcggagctg actgttctgg

30

<210> 14

<211> 264

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vasoactive intestinal peptide promoter

<400> 14

tcgactgcag cccatggccg tcatactgtg tgacgtcttt cagagcactt tgtgattgct 60

cagtcctaag tataagccct ataaaatgat gggctttgaa atgctggtca gggtagagtg 120

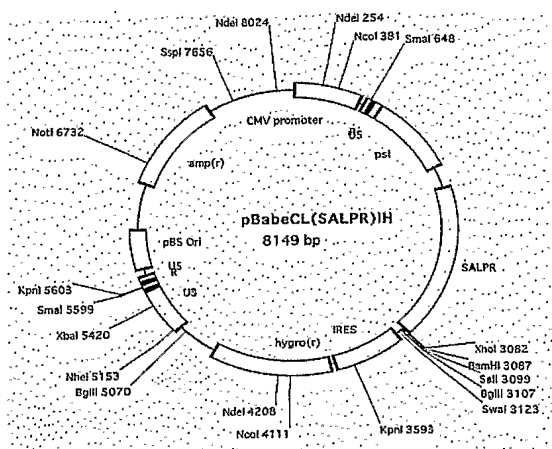
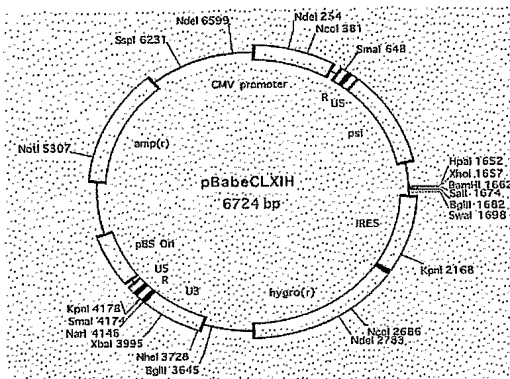
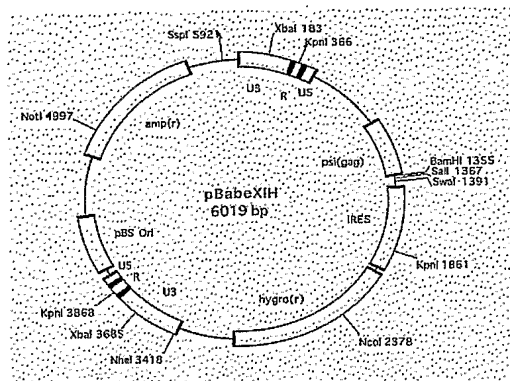
agaagcacca gcaggcagta acagccaacc cttagccatt gctaaggga gagaactggt 180

ggagcctttc tcttactccc aggacttcag cacctaagac agtccaaaa caaaccagaa 240

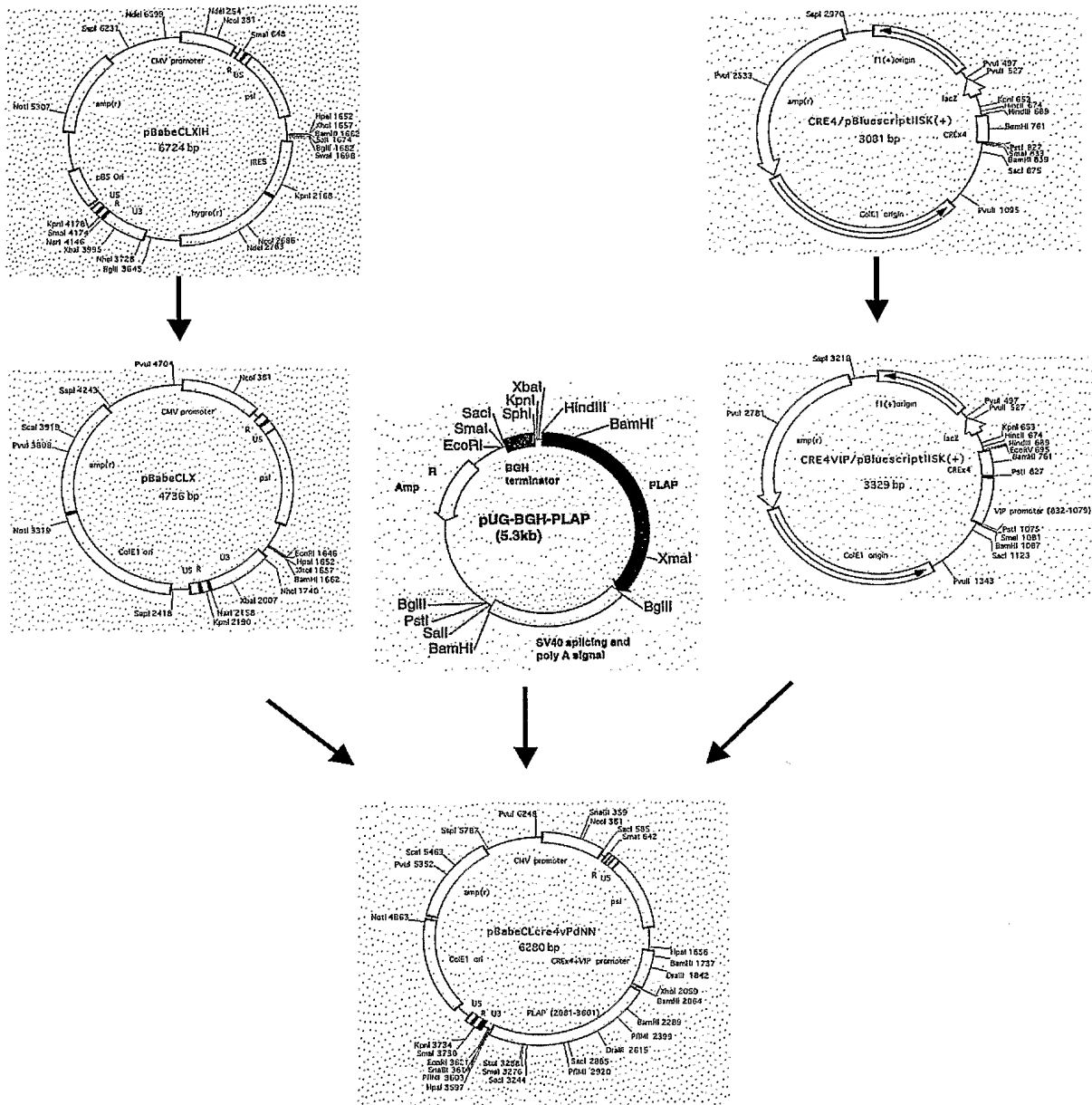
cagtcagctc cgacctgcag tgca 264

【書類名】図面

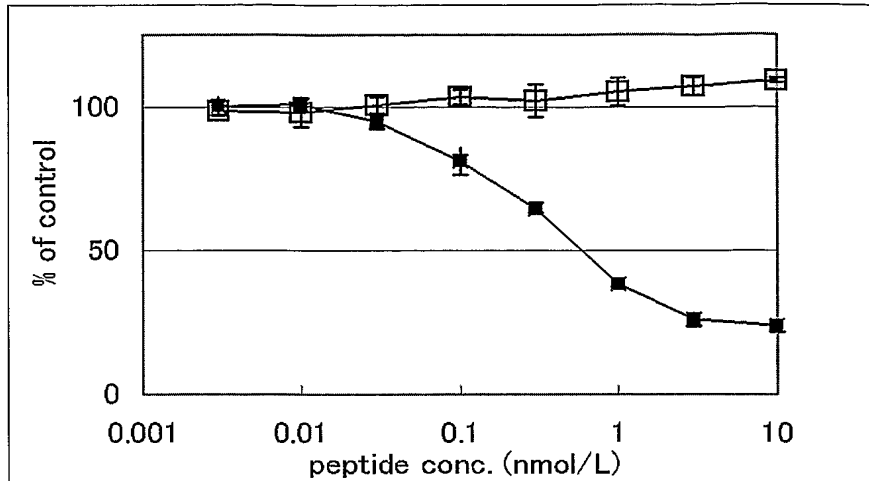
【図 1】



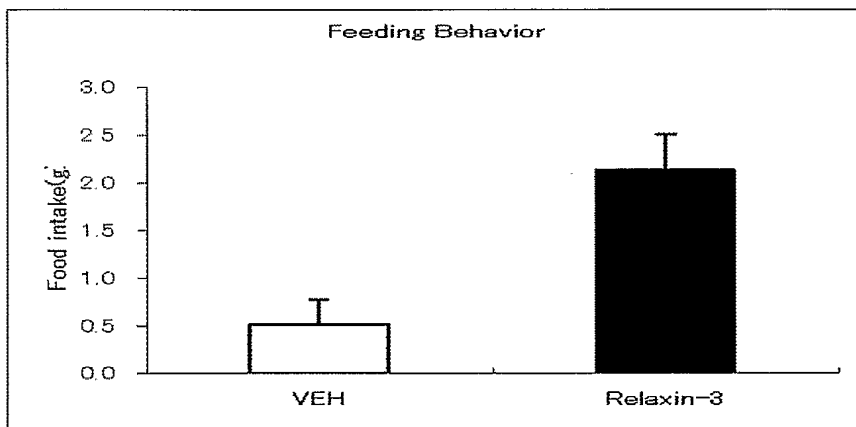
【図 2】



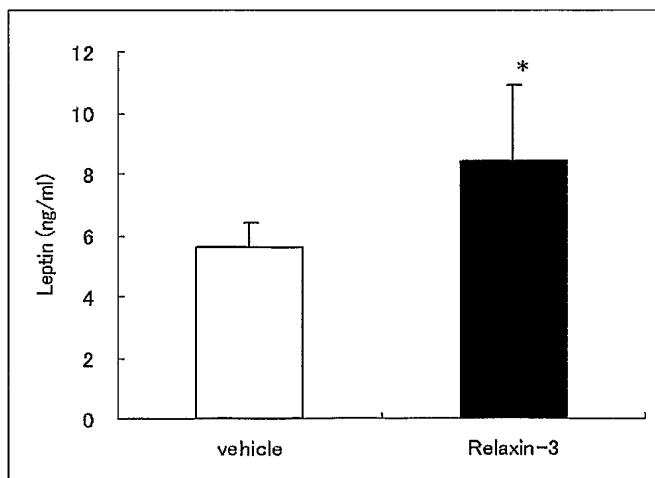
【図 3】



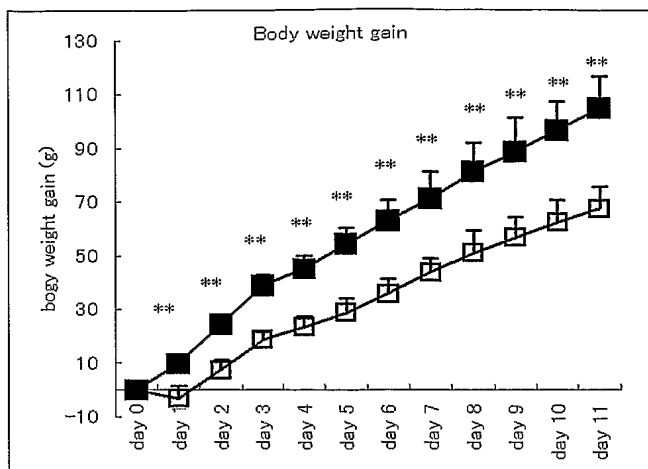
【図 4】



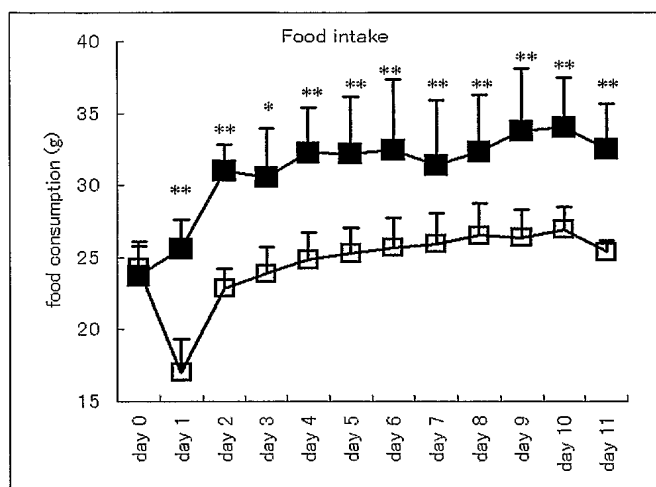
【図 5】



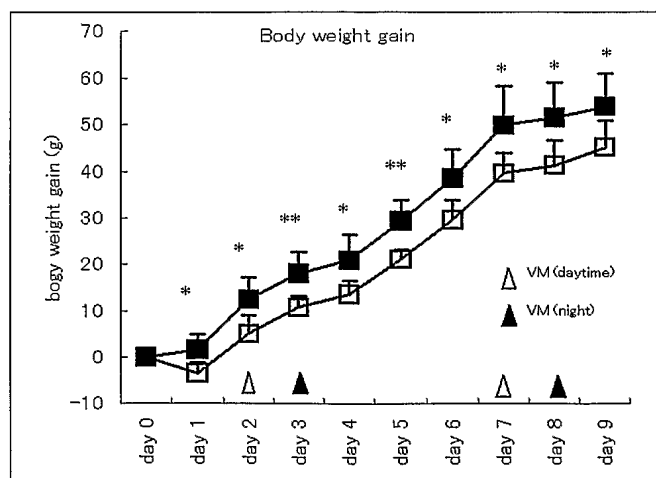
【図 6】



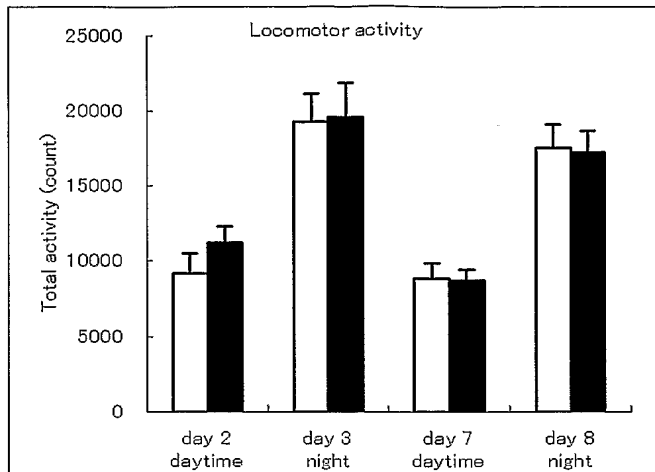
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 有用な摂食亢進作用および体重増加作用を有するポリペプチド、該ポリペプチドを含有する体重増加を必要とする疾患の治療剤、該ポリペプチドの受容体の賦活化、抑制化をする化合物、物質もしくはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、あるいは該ポリペプチドの発現を阻害する物質などを含有してなる摂食抑制剤、抗肥満剤、糖尿病治療剤などを提供すること。

【解決手段】 SALPR と結合するリラキシナー 3 をラット脳室内に投与し、投与後の摂食量、体重増加を観察することにより、リラキシナー 3 が有用な摂食亢進作用および体重増加作用を有することを見出した。

【選択図】 なし。

認定・付加情報

| | |
|---------|--------------------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2 0 0 4 - 3 6 8 5 0 9 |
| 受付番号 | 5 0 4 0 2 1 8 1 3 3 3 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第五担当上席 0 0 9 4 |
| 作成日 | 平成 1 6 年 1 2 月 2 4 日 |

< 認定情報・付加情報 >

| | |
|----------|--------------------------|
| 【特許出願人】 | 申請人 |
| 【識別番号】 | 000000217 |
| 【住所又は居所】 | 東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 1 0 号 |
| 【氏名又は名称】 | エーザイ株式会社 |

特願 2 0 0 4 - 3 6 8 5 0 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 2 1 7]

| | |
|----------|--------------------------|
| 1. 変更年月日 | 1 9 9 0 年 8 月 2 9 日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 1 0 号 |
| 氏 名 | エーザイ株式会社 |